

**Ein Beitrag zum
Hyaluronsäure-Hyaluronidase-
Problem**

**(Klinische und tierexperimentelle Prüfung einer
pharmakologischen Substanz
mit hyaluronidaseähnlicher Wirkung)**

Johannes Klemm

1961



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS INSTITUT UND POLIKLINIK FÜR PHYSIKALISCHE THERAPIE
UND RÖNTGENOLOGIE DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. H. v. Braunbehrens

**Ein Beitrag zum
Hyaluronsäure-Hyaluronidase-
Problem**

**(Klinische und tierexperimentelle Prüfung einer
pharmakologischen Substanz
mit hyaluronidaseähnlicher Wirkung)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johannes Klemm
aus Gornsdorf im Erzgebirge

München 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H.W. PABST

Mitberichterstatter:

Professor Dr. H. v. BRAUNBEHRENS

Dekan:

Professor Dr. Dr. H. EYER

Tag der mündlichen Prüfung: 10.1.1961

M E I N E N E L T E R N
I N D A N K B A R K E I T



INHALTSVERZEICHNIS

- I. EINLEITUNG
- II. PROBLEMSTELLUNG
 - 1. Fragestellung
 - 2. Literatur
- III. ALLGEMEINE WISSENSCHAFTLICHE ZUSAMMENHÄNGE DES
HYALURONSÄURE-HYALURONIDASE-PROBLEMS
 - 1. Kurzer historischer Überblick
 - 2. Entwicklungsgeschichtliche Grundtatsachen für das Bindegewebe
 - 3. Physiol.-chemische Grundtatsachen
 - A) Hyaluronidase
 - B) Hyaluronsäure
 - 4. Biochemische Zusammenhänge
 - 5. Vorkommen der Hyaluronidase
 - 6. Therapeutische Anwendung der Hyaluronidase
- IV. EXPERIMENTELLE PRÜFUNG DES WIRKSTOFFES D
 - 1. Experimentelle Untersuchung über die Beeinflussbarkeit der Membran-permeabilität des Erythrozyten durch Wirkstoff D
 - a) Wissenschaftliche Versuchsgrundlagen
 - b) Markierungsmethodik
 - c) Aufbereitung der Messproben
 - d) Methodik der Messung
 - e) Versuchsergebnisse
 - f) Kritische Würdigung der Versuchsergebnisse
 - g) Markierung nach Methodik 2
 - 1. Versuchsanordnung
 - 2. Messung
 - 3. Versuchsergebnisse
 - 4. Kritische Betrachtung der Versuchsergebnisse
 - 2. Prüfung des Wirkstoffes D auf seine Wirkung als spreading factor mittels Farbstoff
 - a) Versuchsdurchführung an Ratten
 - aa) Versuchsanordnung
 - ab) Versuchsergebnisse
 - 1. tabellarisch
 - 2. graphisch
 - ac) Interpretation der Versuchsergebnisse

- b) Versuchsdurchführung an Kaninchen
 - A) Farbstoff i. v.
 - Aa) Versuchsanordnung
 - Ab) Versuchsergebnisse
 - 1. tabellarisch
 - 2. graphisch
 - Ac) Interpretation der Versuchsergebnisse
 - B) Farbstoff s. c.
 - Ba) Versuchsanordnung
 - Bb) Versuchsergebnisse
 - Bc) Interpretation der Versuchsergebnisse
- 3. Prüfung mittels Elektrophoretogramm, zugleich Prüfung der Verflüssigungswirkung von Wirkstoff D
 - a) wissenschaftliche Grundlagen
 - b) Versuchsanordnung
 - c) Versuchsergebnisse
 - d) Interpretation der Versuchsergebnisse
- 4. Prüfung des Wirkstoffes D mittels Kaninchenohrkammer, Direktbeobachtung der Auswirkung auf Kapillare und Interstitium
 - a) Kurzer Abriss der wissenschaftlichen Zusammenhänge
 - b) Methodik der Kaninchenohrkammer
 - ba) Beschreibung der Kammer
 - bb) Methode der Implantation
 - bc) Pflege und Versuchsvorbereitung der Kammer
 - c) Einzelne Prüfungsverfahren und ihre Ergebnisse
 - ca) Farbstoff i. v. und Wirkstoff i. v.
 - cb) Farbstoff i. v. und Wirkstoff lokal im Beobachtungsfeld
 - cc) Farbstoff lokal im Beobachtungsfeld, Wirkstoff i. v.
 - cd) Farbstoff und Prüfsubstanz lokal im Beobachtungsfeld
 - d) Interpretation der Versuchsergebnisse
- 5. Verschiedene Prüfungsmethoden und ihre Ergebnisse
 - a) Beseitigung von Infiltraten
 - b) Heilungs- und Organisationstendenz von Wunden

V. ZUSAMMENFASSUNG UND VERGLEICHENDE INTERPRETATION.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

VII. LEBENSLAUF

1. Für die pathophysiologischen und pathohistologischen Vorstellungen von Krankheitsprozessen hat das Bindegewebe in der neueren medizinischen Forschung erheblich an Bedeutung gewonnen. Insbesondere sind es die strukturlose Grundsubstanz und die fibrillären Elemente, die einer eingehenden Erforschung unterworfen wurden. Für eine Reihe von Krankheiten und Alterungsprozessen ist es der Hyaluronsäure - Hyaluronidase - Komplex, dem eine entscheidende Rolle innerhalb des pathologischen Geschehens im Bindegewebe zugesprochen wird.

So hat sowohl aus streng wissenschaftlichen, als auch aus klinisch-therapeutischen Gründen das Hyaluronsäure-Hyaluronidase-Problem im letzten Jahrzehnt in der medizinischen Grundlagenforschung eine massgebliche Rolle gespielt. Zahlreiche Forscherteams befassten und befassen sich noch intensiv mit den daraus resultierenden Fragestellungen. Eine kaum überblickbare Anzahl von Publikationen wurde veröffentlicht. Viele Detailfragen gelang es zwischenzeitlich aufzuklären. Eine Vielzahl von Einzelproblemen bedarf jedoch noch der Erforschung.

II. Bis heute gibt es noch keine Möglichkeit, tierische Hyaluronidase (meist aus Stiertestes gewonnen) vollständig zu reinigen. Störende Nebenwirkungen seitens der der Hyaluronidase anhaftenden Restsubstanzen (besonders Eiweiss und Histamin) sind daher unvermeidlich. Bei der wissenschaftlichen Forschung stellt diese Tatsache eine erhebliche Fehlerquelle dar. Aus diesem Grunde liegt es nahe, dass man nach der Möglichkeit sucht, auf dem Wege der Synthese eine Substanz zu entwickeln, die der durch Extraktion und Fraktionierung gewonnenen Hyaluronidase möglichst wirkungsgleich ist, ohne deren bis jetzt noch vorhandene störende Nebenwirkungen zu haben.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, eine pharmakologische Substanz unbekannter Zusammensetzung tierexperimentell und klinisch zu prüfen. Die Fragestellung ist dahingehend begrenzt, dass die Auswirkungen auf die Zellmembran und Blutgefässe im Mittelpunkt der Untersuchung stehen. Über die zu untersuchende Substanz, die im Verlauf der Arbeit mit Wirkstoff D bezeichnet wird, sind zwei Fakten bekannt:

- a) die Substanz hat eine hyaluronidaseähnliche Wirkung und
- b) bis zu einer bekannten Konzentration ist die Substanz für Tier und Mensch gut verträglich.

(LD₁₀₀ Maus: 254 mg /kg

Kaninchen: 10 mg/kg täglich über 4 Wochen reaktionslos vertragen.)

Um eine Antwort auf die Fragestellung zu finden, ist von der Überlegung auszugehen, dass, wenn es sich tatsächlich um ein Substrat mit hyaluronidaseähnlicher Wirkung handeln soll, alle Gesichtspunkte massgebend sind, die auch für gereinigte

tierische Hyaluronidase gelten. Deshalb scheint es der Fragestellung entsprechend, wenn alles über tierische Hyaluronidase Bekannte zur Untersuchung herangezogen wird. Es wurden auf Grund der gleichen Überlegung jene Prüfungsmethoden eingesetzt, die seit Auffindung der Hyaluronidase zur Prüfung derselben von den verschiedenen Autoren entwickelt und angewendet worden sind. Gemäss der gesammelten Erfahrungen wurden jene Prüfungsverfahren bevorzugt, die um der Einfachheit ihrer Durchführung willen als besonders geeignet erschienen. Zusätzlich schien es angebracht, eine neue Methode zu entwickeln, die die Möglichkeit der in vivo Beobachtung von Gefässen im Tierversuch ohne erheblichen operativen Eingriff gestattet.

Wie bereits ausgeführt, ist eine erhebliche Anzahl von Veröffentlichungen, die das Hyaluronsäure- Hyaluronidase-Problem betreffen, publiziert worden. GIBIAN (1) spricht von ca. 1300 Arbeiten, die allein bis 1954 erschienen waren. Inzwischen sind auf Grund der Aktualität des Problems weitere Arbeiten veröffentlicht worden. (Gibian führt in seiner bibliographischen Ergänzung zusätzlich 116 Veröffentlichungen an, die seit 1954 erschienen sind.) Zur Erarbeitung der Grundlagen wurden folgende spezielle Übersichtswerke und Zusammenfassungen herangezogen: für die entwicklungsgeschichtlichen Zusammenhänge H. BOENIG, "Leitfaden der Entwicklungsgeschichte" (2), die Histologie des Bindegewebes betreffend H. HAUSS, "Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes" (3). Über die chemischen Zusammenhänge unterrichten eingehend F. LEUTHARDT, "Lehrbuch der physiologischen Chemie" (4), HOPPE-SEYLER/THERFELDER, "Handbuch der physiologischen und pathologisch-chemischen Analyse" (5), E. LEHNARTZ und B. FLASCHENTRÄGER, "Physiologische Chemie" (6). Über die biochemischen Zusammenhänge sind eingehende Darlegungen in der Veröffentlichung des 7. Kolloquiums der Gesellsch. für physiologische Chemie zu finden, das dem Thema "Chemie und Stoffwechsel von Binde- und Knochengewebe" (7) gewidmet war. Ferner befasst sich R. AMMON in "Fermente, Hormone und Vitamine" (8) eingehend mit dem Hyluronidase-Komplex. Zusammenfassende Übersichten sind von G. WALLENFELS (9), DURAN-REYNALS (10), L. HAHN (11) und K. MEYER (12) veröffentlicht worden. Über die pathologischen und klinischen Gesichtspunkte unterrichtet K. Fr. BAUER in "Ergebnisse der medizinischen Grundlagenforschung" (13), (14). Alle das Gefässsystem betreffenden Zusammenhänge sind in M. RATSCHOW, "Angiologie" (15) eingehend erläutert. Für die Orientierung bezüglich der angewendeten Isotopen-Technik und deren theoretischen Grundlagen waren H. SCHWIEGK, "Künstliche radioaktive Isotope in Physiologie, Diagnostik und Therapie" (16), sowie H. VETTER - N. VEALL, in der Übersetzung von R. WITTENZELLNER, "Radioisotopen-Technik in der klinischen Forschung und Diagnostik" (17) eine wertvolle Wissensquelle. Für die einzelnen Detailprobleme wurden die im Literaturverzeichnis aufgeführten Arbeiten herangezogen.

III. ALLGEMEINE WISSENSCHAFTLICHE ZUSAMMENHÄNGE ZUM HYALURONSÄURE- HYALURONIDASE-PROBLEM.

III. 1. KURZER HISTORISCHER ÜBERBLICK

1928 veröffentlichte DURAN-REYNALS seine Arbeit über den "spreading" - Effekt (18). Er konnte zeigen, dass die Kohlepartikelchen subcutan injizierter Tusche in Gegenwart von Hodenextrakten (Stiertestes) nicht an Ort und Stelle liegen bleiben, sondern sich über eine grössere Fläche ausbreiten. Nach seinem Entdecker nannte man den für dieses Phänomen verantwortlichen Faktor "spreading-Faktor", "Duran-Reynalscher Diffusionsfaktor" oder auch einfach "R-Faktor". Zehn Jahre später bewiesen CHAIN und DUTHIE (19),(20) die Identität dieses "spreading factor" mit der Testeshyaluronidase, die die Kittsubstanz der Bindegewebsfibrillen teilweise auflöst und damit das Vordringen intra- oder subcutan gegebener Stoffe begünstigt. Das zugehörige Substrat hatten K. MEYER und J.W. PALMER 1934 erstmals identifiziert und dargestellt, als sie die Hyaluronsäure als eine neue Mucopolysaccharidsäure fanden. Damit ist der Zeitraum umrissen, in dem die grundlegenden Forschungsergebnisse für das Hyaluronsäure- und Hyaluronidase-Problem gefunden wurden.

III. 2. ENTWICKLUNGSGESCHICHTLICHE GRUNDTATSACHEN FÜR DAS BINDEGEWEBE

Zum Verständnis der Zusammenhänge macht es sich notwendig, die entwicklungsgeschichtlichen Grundtatsachen des Bindegewebes kurz zu skizzieren.

Im Zuge der embryonalen Entwicklung entsteht aus dem befruchteten Ei die Anlage des Keimlings als Keimschild, bestehend aus Endoderm und Ektoderm. Etwa von der 3. Woche an beginnt sich ein Mesoderm zu bilden. Es entsteht aus den Bereichen des Urdarmdaches. Wir verstehen darunter das rechts und links der Rückenseite gelegene, noch einheitlich epithelial gebaute, mittlere Keimblatt des Keimlings. Streng dagegen ist vom Mesoderm der Begriff des Mesenchyms abzugrenzen. Mesenchym ist der Sammelbegriff für alles embryonale Bindegewebe. Dieses stammt aus vier verschiedenen Abschnitten des Mesoderm. Man unterscheidet nach BOENIG (2):

M E S E N C H Y M

A. Achsiales

I. Quelle: Sklerotom

liefert: 1. Achsenskelett.

2. Hüllen des Zentralnervensystems.

B. Parietales:

II. Quelle: Kutisplatte.

liefert: 3. Bindegewebe der dorsalen Körperwand.

III. Quelle: Parietales Blatt.

liefert: 4. Bindegewebe und Skelett der Extremitäten.

5. Bindegewebe der seitlichen und ventralen Körperwand.

C. Viszerales:

IV. Quelle: Viscerales Blatt.

liefert: 6. Bindegewebe und Muskulatur der Eingeweide.

Histologisch haben die verschiedenen mesenchymalen Quellen keine Unterschiede des aus ihnen stammenden Bindegewebes zur Folge. Das Mesenchym bildet alles Bindegewebe, Knorpel- und Knochengewebe, Blutgefäße und Blut und einen Teil der quergestreiften Muskulatur des Keimlingskörpers aus. Nach neueren Vorstellungen wird nach SCHWARZ (22) der Begriff des Mesenchyms abgewandelt verstanden. Beim Embryo bildet sich in einer frühen Stufe zwischen den sogenannten Primitivorganen ein Zellretikulum. Unter diesen Primitivorganen versteht man Ektoderm, Neuralrohr, Ursegmente, Corda, Seitenplatten und Darmrohr. Dieses Zellretikulum ist in dieser Entwicklungsstufe das Mesenchym. Aus diesem Mesenchym entwickeln sich später u. a. alle Binde- und Stützsubstanzen. Die Herkunft der ursprünglichen Mesenchymstellen ist verschieden. Ein grosser Teil stammt aus den Ursegmenten und Seitenplatten, also vom Mesoderm. Es gibt auch andere Quellen des Mesenchyms. Ein Teil des Kopfmesenchyms lässt sich nicht auf das Mesoderm zurückführen. Teile der Ganglienleiste sind an der Mesenchymbildung beteiligt. Zusammenfassend lässt sich somit sagen: nicht alle Binde- und Stützsubstanzen stammen also vom Mesoderm ab, aber alle diese Gewebe leiten sich vom Mesenchym ab.

Es erscheint weiterhin wichtig, den histologischen Begriff der Grundsubstanz abzugrenzen. Nach GIBIAN (23) will man darunter einen morphologischen Begriff verstanden wissen, der ein Fehlen mikroskopischer Strukturierung beinhaltet. Zwischenzeitlich gelang es jedoch elektronenmikroskopisch feinste Filamente nachzuweisen (24).

Nach neuesten Gesichtspunkten versteht man unter Grundsubstanz die Zwischensubstanz, die in Bindegeweben, Knochen und Knorpel gefunden wird. Diese Zwischensubstanz besteht aus Fibrillen und Kittsubstanz. Beide sind im Elektronenmikroskop deutlich zu unterscheiden, (22). R. MEIER führt in "Medizinische Grundlagenforschung" (14) über die biochemischen Kausalzusammenhänge der Entwicklungsorgane aus, dass das Zwischengewebe aus einer eiweisshaltigen Flüssigkeit mit physiologischen Salzgehalt, der undifferenzierten kollagenen Grund-

substanz, den kollagenen Fasern verschiedener Typen, den elastischen Fasern und ausserdem der Basalmembran, die die Verbindung des Zwischengewebes mit Zellen und Gefässen herstellt, besteht (25, 26).

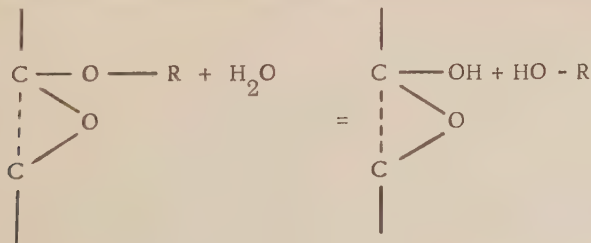
Die kollagenen Fasern sind von einer bestimmten Struktur und Form und meistens in Bündeln verschiedener Dicke angeordnet. Sie haben verschiedene Konstitution. Im Prinzip bestehen sie aus Eiweiss und Mucopolysacchariden. Als Mucopolysaccharide sind in der Hauptsache Chondroitinschwefelsäuren, Keratosulfosäuren, Hyaluronsäuren, Glutamine, Glukuronsäuren und Heparatinsulfate zu verstehen. Diese Substanzen sind in jedem kollagenen Mischungsverhältnis vorhanden.

Glykoproteine und Mucopolysaccharide sind bedeutende Bauelemente der strukturlosen Kittsubstanz, in der die Kollagenfasern der mesenchymalen Gewebe eingebettet sind. Es ist anzunehmen, dass ihre stark hydratisierten Kettenmoleküle ein gelartiges, ultrastrukturelles Netzwerk um die Kollagenfaser bilden, das die Diffusion von molekular gelösten Stoffen, sowie von Wasser zulässt, aber einen freien Transport von kolloidalen und gelösten Partikelchen hindert. Teilweise scheinen sich beide Substanzen dabei in Verbindungen mit den Proteinen vorzufinden.

III. 3. PHYSIOLOGISCH-CHEMISCHE GRUNDTATSACHEN.

A. Hyaluronidase

Nach AMMON (8) ist die Hyaluronidase in die Gruppe der Fermente oder Enzyme im Sinne eines biologischen Katalysators einzureihen. Es ist wichtig, darauf hinzuweisen, dass diese Katalysatoren vom lebenden Organismus selbst erzeugt werden und organische kolloide Substanzen sind. Es handelt sich bei der Hyaluronidase um eine Carbohydase, also um eine Hydase, die die Lösung oder Bildung glykosidischer Bindungen nach dem Schema bewirkt. Glykosid ist die allgemeine



Bezeichnung für ein Zuckervollacetal, bei dem die freie Acetalhydroxylgruppe des Monosaccharids durch den Rest R substituiert ist, während die anderen den bei allen Zuckern vorliegenden Ringschluss des Moleküls vermitteln. R ist meist ebenfalls ein Zuckerrest. Die Carbohydrasen stellen einer einheitlichen Einteilung erhebliche Schwierigkeiten entgegen. Es handelt sich letztlich um eine grosse Zahl einzelner Fermentwirkungen an dem äusserst umfangreichen Material der Kohlehydrate. Nach neuerer Auffassung erfolgt die Einteilung nach gruppenspezifischen Gesichtspunkten. Dementsprechend teilt man ein in:

Glykosidasen (Oligase + Heterosidase)
und Polyasen.

Erstere greifen die Polysaccharidenicht an. Polyasen andererseits können Oligosaccharide spalten, vorausgesetzt, dass diese den spezifischen Glykosidrest enthalten.

Die weitere Unterteilung der Polyasen ist gleichfalls nur schwer durchführbar, weil die zugehörigen chemischen Substrate chemisch nur wenig genau definiert sind. Als Charakteristika der Definition dienen:

- a) optische Zugehörigkeit
- b) sterische Lage der glykosidischen Bindungen
- c) Konfiguration
- d) Grösse des Halbacetalringes
- e) Verzweigung der Polysaccharidkette.

Ploetz schlägt zur Einteilung der Polyasen folgendes Schema vor:

Enzym	Substrat
- 1, 4 - Glukonasen	Stärke, Glykogen
- 1, 6 - Glukonasen	Dextran
Glukanasen	Cellulose, Lichenin, Hefeglucan
Fructanasen	Inulin, Laevan
Cytasen, Xylanasen, Mannasen, Arabanasen	Xylan, Mannan, Araban
Polyuronidasen	Pektin, Alginsäure
- 1, 4 - Poly-N-acetyl- glukosaminidase (Chitinase)	Chitin
Mucinasen	
Hyaluronidase	Hyaluronsäure
Chondroitinase	Chondroitinsulfat,

Die weitere Unterteilung der Mucinasen erfolgt, wie aus oben stehendem Schema ersichtlich, gleichfalls nach dem Substrat. Andere Autoren bevorzugen die Einteilung der Mucinasen, indem sie die als Substrat zugehörigen Polysaccharide in

zwei Gruppen unterteilen. Als erste sind die neutralen Mucopolysaccharide zu nennen, die aus N-Acetylhexosamin in Verbindung mit einfachen Zuckern (Hexosen und Methylpentosen) aufgebaut sind. (z.B. Blutgruppensubstanzen, Bac. bifidus-Faktor). Die zweite Gruppe bilden die sauren Polysaccharide, die Uronsäuren, N-Acetylhexosamin und veresterte Schwefelsäuregruppen enthalten (32). Zweifellos haben die zugehörigen Mucinasen ihren besonderen Spezifitätsbereich. Mangels hochgereinigter Fermentpräparate ist dieser jedoch nicht genau zu umreißen. Dazu kommt, dass auch über die Struktur und Konstitution der zugehörigen Substrate keine endgültige Klarheit herrscht. Man legt sich daher nicht wie bei den übrigen Carbohydrasen auf eine systematische Einteilung dem Glykosylrest nach fest, dessen Bindung bevorzugt gespalten wird.

Man kann demzufolge die Hyaluronidase als eine Mucinase mit saurem Substrat definieren. Die tierische Hyaluronidase ist chemisch eine poly-beta-Hexosaminase.

Über den Reaktionsmechanismus werden von den Autoren verschiedene Vorstellungen geäußert. Es wird angenommen, dass die Carbohydrasen prosthetische Gruppen haben, die den Kohlehydraten nahestehen. Diese scheinen die Haftgruppen des Enzyms für das Substrat zu sein. HELFERICH et al. (28) sehen in der Möglichkeit, die Fermentwirkung der Carbohydrasen mittels Carbonyl zu hemmen, den Beweis für das Vorhandensein der prosthetischen Gruppen. Nach LANGENBECK (29) lässt sich annehmen, dass der gesamte Reaktionsmechanismus auf einer Umacetilierung, einer Transferreaktion beruht, die von einer Hydrolyse des Zwischenproduktes gefolgt ist.

Während die Deutung des Spaltungsmechanismus bei den Disacchariden theoretisch weniger Schwierigkeiten bereitet, drängen sich bei den Polyasen einige besondere Fragen auf. Von den Polyasen weiss man, dass sie aus den Polysacchariden nur Oligo- und Disaccharide abspalten können. Dabei gibt es offenbar zwei verschiedene Phasen des Abbaues. Phase 1 mit hoher Umsatzgeschwindigkeit dauert je nach Molekülgrösse des Substrats bis zu einem Hydrolysegrad von 10 - 25 %. Phase 2 zeigt dann einen langsameren mit der Zeit linear ansteigenden Ablauf der Reaktion. Die untere Grenze der Spaltbarkeit des Hyaluronsäure - Hyaluronidasesystems liegt nach HOUCK et al. (30) beim Hexasaccharid.

Weiterhin hat man sich bemüht zu klären, ob die Polyasen mit ihren Substraten nach dem Einketten- oder Mehrkettenprinzip ("Single-change oder Multi-change mechanism") reagieren. Nach dem Einkettenprinzip baut ein Polyasemolekül ein- und dasselbe Polysaccharidmolekül sukzessiv bis zu einem bestimmten Grenzwert der Kettenlänge ab. Bei Erreichung dieses Grenzwertes der Kettenlänge beginnt die Affinität des Substrates zum Fermentmolekül abzunehmen. Erst dann wird eine neue Kette vom Fermentmolekül in Angriff genommen.

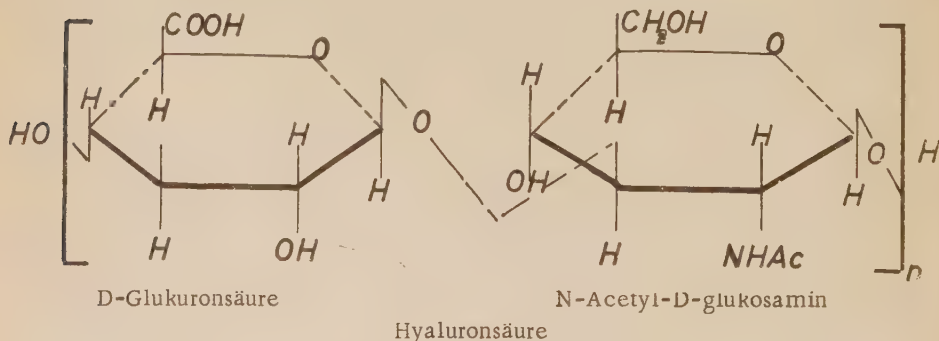
Nach dem Mehrkettenprinzip geht eine enzymatische Reaktion vor sich, wenn bei allen Polysaccharidmolekülen mit statistisch geregelter Häufigkeit jeweils nur eine glykosidische Bindung gelöst wird. BAILEY et al. (31) vertreten die Ansicht, dass beide Möglichkeiten Extremfälle einer grundsätzlich identischen Reaktionsweise darstellen.

B. Hyaluronsäure

Die Hyaluronsäure ist das eigentliche Substrat der Hyaluronidase. Sie ist kein einheitliches Produkt, zumindest besitzt sie kein einheitliches Molekulargewicht. Es wird von den verschiedenen Autoren zwischen 300.000 und 500.000 angegeben. Es muss deshalb daran gedacht werden, dass sich die Hyaluronsäuren, die aus verschiedenen Gewebsteilen gewonnen werden, womöglich auch strukturell unterscheiden.

Nach neueren Erkenntnissen besteht die Hyaluronsäure aus abwechselnd aneinander gereihten Glukuronsäure- und N-Acetyl-Glukosaminresten. Die Glukuronidbindungen sind Beta-1, 3- und die Glukosaminylobindungen sind Beta-1, 4- Brücken (33, 34, 35) und nicht, wie man vorher annahm, ebenfalls 1, 3-Verknüpfungen (36).

Die Strukturformel ist wie folgt konfiguriert:



Die Kettenmoleküle haben eine durchschnittliche Länge von ca. 10 000 Å. Erstmals wurde die Hyaluronsäure durch Meyer und Palmer 1934 dargestellt (21).

Die Aufklärung erfolgte mit den üblichen Methoden der organischen Chemie, Perjodatoxydation, Methylierung und Hydrolyse. Ihre Stabilität ist weitestgehend vom p_H -Wert des umgebenden Mediums abhängig. Ihre Neigung zur Salz- und Komplexbildung ist erwiesen. Besonders mit basischen Farbstoffen bildet sie bei entsprechendem p_H leicht ausfallende Komplexe. Dies ist bei entsprechenden Versuchen unter Verwendung von Farbstoffen zu beachten.

In Wasser sind die Hyaluronsäuren leicht und optisch klar löslich, in organischen Lösungsmitteln unlöslich. Der optische Drehwert in neutraler wässriger Lösung liegt bei $(\alpha)_D^{20-25} = -70^\circ$ bis -80° . Die Ultrafiltrierbarkeit ist von der Molekülgrösse und dem umgebenden Milieu abhängig. Die Viskosität ist eine ihrer auffälligsten Eigenschaften. Sie wird beeinflusst vom p_H -Wert und damit der Gegenwart nicht ionogener und ionogener Verbindungen. Ferner spielt die jeweilige Temperatur eine massgebliche Rolle für die Viskosität. Hyaluronsäurehaltige Flüssigkeiten sind deutlich elastisch. Über die Strömungsdoppelbrechung und Lichtstreuung bestehen keine einheitlichen Ansichten. Im Infrarot-Spektrum hat Hyaluronsäure ein deutliches Absorptionsband. Eiweissfreie Hyaluronsäure-Präparate wurden mehrfach elektronenoptisch dargestellt. Die Teilchengestalt wird im elektronenoptischen Bild als statistisches Knäuel ("random coil") beschrieben. Die Angaben über chemische und physikalische Eigenschaften der Hyaluronsäure stammen von GIBIAN (1).

III. 4. BIOCHEMISCHE ZUSAMMENHÄNGE.

Am intensivsten ist diesbezüglich bisher die Hodenhyaluronidase des Stieres untersucht worden. Es gelang dabei nicht, hochgereinigte Hyaluronidase-Präparate herzustellen. Durch die Fraktionierung mit $(NH_4)_2SO_4$ und Alkohol erhält man eine etwa 80-fache Anreicherung aus den Rohpräparaten des Stierhodens (37). In neuerer Zeit hat man auch gute Erfahrungen mit Ionenaustausch gemacht (38, 39). Das p_H -Optimum ist abhängig von der Ionenstärke des Mediums (40). Es kommen dem Enzym offenbar zwei verschiedene Wirkungen zu. Die eine besteht in der Depolymerisation des Substrats ohne Steigerung der Reduktionsfähigkeit und beruht wahrscheinlich nur auf einer Desaggregation der nativen Hyaluronsäuremoleküle, während die zweite hydrolytischer Natur ist.

Unter pathologischen Verhältnissen können im Körper allgemeine Verschiebungen des Hyaluronsäure-Hyaluronidase-Gleichgewichtes selbst auftreten. Es können sich aber auch im Bereich der körpereigenen Inhibitoren und wohl auch Aktivatoren Veränderungen einstellen, die nun ihrerseits auf das Gleichgewicht einwirken. Bei diesem ausserordentlich komplizierten Ineinandergreifen verschiedener Mechanismen leuchtet es ein, dass vielseitige und in vielen Fällen noch nicht geklärte Störungen resultieren, z.B. Veränderungen an den Grenzflächen der Kapillaren und Zellmembranen, die wiederum auf das Ferment-Substrat-System rückwirken. Die Bearbeitung dieses gesamten Fragenkomplexes erfolgt verständlicherweise nicht nur von biochemischer, sondern auch von therapeutischer und klinischer Seite her.

Es wurden auch Untersuchungen darüber angestellt, ob nicht das gleiche Ferment, das für den spreading-factor verantwortlich ist, das infiltrative Wachstum der

malignen Tumoren fördert (41, 42). Von allen tierischen Geweben enthalten Hodengewebe, wie bereits ausgeführt, am meisten Hyaluronidase. Tumorextrakte dagegen sollen nur wenig aktiv sein (43, 44). Nach einer Arbeit von SIMPSON (45) soll die lokale Injektion von Hyaluronidase an der Basis von Impftumoren das infiltrative Wachstum der Tumoren fördern und zur Zerstörung der Muskulatur in der Umgebung der Tumoren führen. Ausserdem soll die Metastasierung der Tumoren begünstigt werden. Nach neueren Untersuchungen von KIRLUK et al. (46) an gutartigen und bösartigen menschlichen Tumoren ist es jedoch wahrscheinlich, dass sterile Tumoren überhaupt keine Hyaluronidase enthalten; die früher in Tumoren gefundene Hyaluronidase soll von Bakterien stammen, da diese Neoplasmen infiziert gewesen seien.

Von besonderer Bedeutung ist das Vorkommen der Hyaluronidase in der Kapsel pathogener Bakterien (Pneumoc., Streptoc., Gasbrandbaz., usw.). Die Fermente lösen beim Eindringen der Bakterien in die Gewebe durch Hydrolyse der Mucopolysaccharidsäuren die Grundsubstanz teilweise auf und erleichtern dadurch die Invasion der Bakterien. Sie wirken somit als spreading-factor. MC LEANE et al. (47) stellten gleichfalls fest, dass das Fortschreiten einer bakteriellen Entzündung von der Hyaluronidase der Erreger abhängt. Es wurde deshalb versucht, das Ferment des Erregers zurückzudrängen. KORTH et al. (48) prüften deshalb, ob proteolytische Fermente wie Trypsin und andere die Hyaluronidase zu inaktivieren, das heisst hydrolytisch aufzuspalten vermögen. Das ist der Fall. Die Kombination von Trypsin mit Antibiotika, vor allem Penicillin, erscheint daher nach GREUER et al. (49) angezeigt, zumal das Trypsin gleichzeitig auch Toxine von Bakterien unwirksam machen kann.

Nach BAUER (14) sind die Mucopolysaccharide und ihre Proteinverbindungen für die physiologischen Eigenschaften der mesenchymalen Grundsubstanz des Bindegewebes von grösster Bedeutung. Das Bindegewebe wiederum untersteht hormonalen Einflüssen, z.B.:

Myxoedem	- Schilddrüse (schleimige Flüssigkeit im BGW angereichert)
Hahnenkamm	- Sexualhormon
Akromegalie	- Wachstumshormon
Exophthalmus	- Thyreoidea, Hypophyse.

Experimentell konnte festgestellt werden, dass Vitamin P und Nebennierencortikoide alle drei Elemente des Bindegewebes - Zellen, Grundsubstanz und Fasern - in ihrer Entwicklung hemmen können. Der gleiche Verfasser zieht den Schluss, (50, S. 229, 440), dass Vitamin P und Cortison die Hyaluronidasewirkung zu hemmen vermögen.

Das Bindegewebe und in ihm der Hyaluronsäure- und Hyaluronidasekomplex spielen überhaupt bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine wich-

tige Rolle. Viele Erscheinungen des Alterns gehen auf Veränderungen mesenchymalen Gewebes zurück. Ebenso stellen Veränderungen der Grundsubstanz und der sie aufbauenden Stoffe bei der Atherosklerose und den Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises einen massgeblichen Faktor dar. Das Bindegewebe der Haut besteht aus der Grundsubstanz, die im wesentlichen aus Eiweissverbindungen der Hyaluronsäure und der Chondroitinschwefelsäure aufgebaut ist, sowie den kollagenen und elastischen Fasern. Die Proteine der Grundsubstanz selbst sind noch kaum erforscht. Die Viskosität der Grundsubstanz ist, wie bereits ausgeführt, von der Elektrolytkonzentration abhängig (51). Ausserdem führen Acetylierung und Sulfurierung, sowie die Einwirkung von Vitamin C in Gegenwart von H_2O und Ca^{++} und die Anwesenheit von Schwermetallsalzen (52) oder Phenylhydracin (53) zur Viskositätsminderung. Danach scheint es überhaupt fraglich, ob der erste Schritt der enzymatischen Depolimerisation des hochpolymeren Mucoids auf der Carboxydrasewirkung des Enzyms beruht.

Die Hyaluronsäure scheint auch eine wichtige Rolle als Kittsubstanz zwischen den einzelnen Follikelzellen des in der Tube befindlichen Eies zu spielen. Die Frage, ob sie auch als Dichtungsmittel in den Blut- und Lymphkapillarwänden dient, ist noch nicht entschieden. Nach RATSCHOW (15) ist es unwahrscheinlich.

In elektrophoretisch aus menschlichem Serum dargestellten Albumin kommt ein Inhibitor für Hyaluronidase aus Rinderhoden vor. Dieses thermolabile Protein soll bei malignen Erkrankungen im menschlichen Serum vermehrt sein (53). Insgesamt gesehen bestehen über die biochemischen Zusammenhänge, soweit sie das Hyaluronsäure-Hyaluronidaseproblem betreffen, noch keine endgültigen zusammenhängenden Vorstellungen. Die bisher gewonnenen Ergebnisse sind fragmentarisch.

Nach GIBIAN (1) zeichnet sich Hyaluronidase am biologischen Objekt durch die spreading-Wirkung aus. Ferner vermag sie die Permeabilität von Membranen zu erhöhen, die Schranke zwischen Kreislauf und Synovialmembran zu durchbrechen. Deutlich ist die Wirkung von Hyaluronidase auf hyaluronsäurehaltige Körperflüssigkeiten. Die Viskosität derartiger Flüssigkeiten wird mehr oder minder stark herabgesetzt. Nach S. AMANTE (54) wird die Granulation von Hautwunden durch Hyaluronidasezusätze gefördert. Diskutiert werden die experimentelle Erzeugung des Enophthalmus (55), die Erhöhung der Dehnbarkeit von Rattenschwanzgelenken (56), die Verhärtung der Zwischenwirbelscheiben (57), die Anormalisierung von Vibroblastenkulturen (58) und die Veränderung des Kolloidzustandes des Harnes (59) durch Hyaluronidasegaben. Weitere Untersuchungen, wie sie von verschiedenen Autoren vorgenommen wurden, sind meist nicht ohne Widerspruch geblieben, so die Beeinflussung des Blutgerinnungssystems, die Beschleunigung der BKS, Steigerung der leukozytären Phagozytose, hämolytische Auswirkungen, Einwirkungen auf Zähne und Verflüssigung von Sputum.

III. 5. DAS VORKOMMEN VON HYALURONIDASEN.

Sicher erwiesen ist bisher das Vorkommen von Hyaluronidase in Testesextrakten verschiedener Säugetierarten, in einigen tierischen Giften, besonders in Schlangengiften und in einigen Bakterienarten. Aus anderen Quellen gelang es bisher nicht, Hyaluronidase mit Sicherheit zu gewinnen. Die Angabe, dass auch andere Gewebe Hyaluronidase enthalten, beruht fast ausschliesslich auf der Wirkung solcher Gewebsextrakte auf das biologische Substrat. Inwieweit diese Wirkungen auf Verunreinigung bestanden oder eine echte Hyaluronidasewirkung darstellten, ist nicht mit Sicherheit zu sagen. GIBIAN (1) veröffentlicht eine Tabelle, in der er den Fermentgehalt verschiedener Tierorgane eingehend untersucht hat.

Über das Vorkommen von Mucopolysaccharidsäuren, so weit es histologisch nachweisbar ist, scheinen eindeutigere Ergebnisse vorzuliegen. In der Haut soll besonders das Stratum papillare und die Basalmembran reich daran sein. Die Whartonsche Sulze der Nabelschnüre, die Media und Intima der grossen Gefässe, der Hahnenkamm, Knorpelgewebe, Lungengewebe und die Pleura weisen einen hohen Gehalt an Mucopolysaccharidsäuren auf. Kollagene und retikuläre Fasern, wie überhaupt die Basalmembranen des Bindegewebes und alle mesenchymalen Gewebe sind hyaluronsäurehaltig. Die basophilen Ehrlichschen Mastzellen werden als Prototyp mucopolysaccharidhaltiger Zellen angesprochen. Man vermutet sogar, dass sie eine der Bildungsstätten für Mucopolysaccharidsäuren sind (1, S. 29), auch als Heparinocyten bezeichnet.

III. 6. THERAPEUTISCHE ANWENDUNG.

Die Monographie von Gibian schliesst im Wesentlichen mit den bis 1954 veröffentlichten Arbeiten ab. Ein ergänzender Literaturhinweis bringt bis 1959 kaum neue Angaben über die Anwendung. Aus klinischem Interesse wurden deshalb alle erreichbaren Arbeiten gesammelt, die in der Zeit von 1954 bis 1959 erschienen und sich mit der therapeutischen Anwendung von Hyaluronidase befassen. Ca. 200 Arbeiten wurden als wichtig ausgewählt und mit Titel registriert.

Allgemeine Übersichten über die Anwendungsmöglichkeiten der Hyaluronidase veröffentlichten GUILLEMAN (83), KERMOGANT (84), MEIER-STAUFFER (85), SCARBOROUGH (85), PARIS-RUIZ (87), PEDICH (88), KÜHNELT (89), BRANCHI (90) und ROSOLLEK (91).

Übersichten für die Anwendung in der Chirurgie geben OBERNA (92), BURKHARDT (93), ADERHOLD (94) und KATZ (95). Über spezielle chirurgische Anwendung berichten bei degenerativen Gelenkerkrankungen RÖSSING (96), bei Gelenkverletzungen und Unfällen LI (97), KÖSTLER (98), GJRUP (99), sowie BODIAN (100),

KENDALL (101) und SÁNDOR (102). PRIOROV (103) publiziert über Erfolge bei traumatischen Schäden, ROSENBERG (105) und KRAMER (106) konnten die Heilungstendenz langsam abheilender Wunden mit Hyaluronidase beschleunigen; ähnliches berichtet BRUCK (107) aus der Unfallheilkunde. Die Anwendung von Hyaluronidase-Präparaten zur postoperativen Behandlung von Wunden im Abdominal-Bereich zur Vermeidung von Adhäsionen scheint nach CANÓNICO (108), WEISS (109), MYBURGH (110), GIGLIO (111) und BENCHIMOL (112) indiziert. Über gute Erfahrungen in der Behandlung des Keloids berichten GATHINGS (113), BELISARIO (113a) und GREDA (114). Versuchsweise und mit wechselndem Erfolg setzten SCHNEIDER (115) die Hyaluronidase in der Chirurgie des Anorectalbereiches und OTAÍZA (116) bei Hypodermoclysis rapida ein. Günstig scheint nach CATCHPOOL (117), CLIFFTON (118) und SPIER (119) die Verwendung von Hyaluronidase bei infizierten Wunden aller Körperregionen zu sein.

Die Anwendung von Hyaluronidase in der Infiltrationstherapie gehört zu den ersten bekannten Verwendungsmöglichkeiten. Über weitere Erfahrungen veröffentlichen HEYMANN (120), WILD (121, 122), DANIS (123) und DURRIEU (124) beim Einsatz von Hyaluronidase in der Lokalanästhesie. SCHNEIDER (125) fasst die Ergebnisse der Verwendung von Hyaluronidase für die Lokalanästhesie im Bereich der Anorectalregion bei chirurgischen Eingriffen zusammen. SCOTT (126) publiziert über epidurale, SILIO (127) über parametrane Anaesthetie, HUDGKINS (128) über Anaesthetie im Bereich von Uterus und Cervixunter Verwendung von Hyaluronidase. GAGLIARDI (129), HIBBARD (130), MASSANO (131), WOOSLEY (132) und DE ALVAREZ (133) referieren über den Einfluss der Hyaluronidase für die Blockierung des Nervus pudendalis.

Erstaunlich ist die Vielfalt der Anwendungsmöglichkeiten, die die Gynäkologen der Hyaluronidase eröffnet haben. VALENTIN (134) gibt einen zusammenfassenden Überblick; FRENZEL (135), MINK (136 und 137), RIMBACH (138) veröffentlichen über die Verwendung der Hyaluronidase zum Dammschutz bei der Geburt. BOLLODI (139) und VROBELT (140) diskutieren die Geburtserleichterung mit Hyaluronidase im allgemeinen. SAVI (141), LABRUM (142) und DUTTON (143) berichten über raschere Resorption von Oxytocin und Ergometrin. Praeventiv setzten Christianini (144) und SAVI (144a), sowie JONAS (145) Hyaluronidase in der Geburtshilfe ein. LOUROS (146) überrascht mit günstiger Hyaluronidasewirkung bei Eklampsie. Die Behandlung chronischer Parametrididen wurde durch Hyaluronidase nach ZALESKI (147), BAYER (148) und REIFFENSTUHL (149) günstig beeinflusst. Eine Kombinationstherapie mit Antibiotica und Cortison unter Verwendung von Hyaluronidase bei Genitalinfektionen empfehlen BLATON (150), GARNIER (151), KLUGER (152) und KUPMAN (153). SCHMIDT-MATTHIESEN (154) setzte die Hyaluronidase bei der Aplasia vaginae, RAMIERZ (155) bei der exfoliativen Schwellung der labiae inferiores und DU CONDRAÏ (156) bei weib-

licher Sterilität mittels intratubarer Hyaluronidaseinjektion mit Antibiotica ein. MINK (157) berichtet über intramammäre Injektionen eines Hyaluronidase-Streptokokkengemisches (geringer Virulenz) bei Mastitis puerperalis, COLACURCIA (158) und CAPPETI (159) bei Schwellungen der Mamma.

In der Kinderheilkunde konnte die Hyaluronidase-Therapie kaum Fuss fassen. Lediglich zwei Arbeiten konnten gefunden werden. MONERO RODRÍGUEZ (160) gibt Bericht über Verwendung der Hyaluronidase zur Dehydratation des Säuglings und älteren Kindes, sowie FREISLEDER, W. (161) zur Behandlung subduraler Ergüsse im Säuglingsalter.

Die Innere Medizin scheint die Möglichkeiten dieses therapeutischen Hilfsmittels frühzeitig erkannt zu haben. BODENHEIMER (162) gibt einen Gesamtüberblick. Über bessere Applikationsmöglichkeiten durch Hinzufügung von Hyaluronidase bei subcutaner oder intramuskulärer Medikation berichten GIBIAN (60), MATTHEWS (61). Die Verabreichung mancher Medikamente parenteral ist schmerzhaft. Durch Diffusionsbeschleunigung mittels Hyaluronidase können die Schmerzen nach STETTBACHER (61a) reduziert werden. Lokal verabreichte Medikamente vermögen nach DORN (163), STELZER (164), MONNET (165) und PICINELLI (166) eine grössere und raschere Wirkung zu erzielen, wenn man Hyaluronidase beifügt. Die Nachbehandlung von Frakturen gestaltet sich unter Hyaluronidase nach DE NUNNO (167) günstiger. Eine Behandlungsmethode mit Hyaluronidase bei angeborenem Schiefhals empfiehlt PERES (168). Günstige Ergebnisse sah GARRET (169) bei der Behandlung von Nervenschäden der Leprakranken. EARP (170) konnte den Verlauf der Meningitis besser beeinflussen. PEZZINI (171) berichtet über eine Kombinationstherapie bei malignen Neoplasmen. BERGONZINI (172) und VILANOVA (172a) referieren über die Möglichkeit der Verwendung von Hyaluronidase in speziellen Fällen der Strahlentherapie. Allgemein scheint sich nach LEMKE (173), FINOCHIETTO (174), ANDERSON (175), CORTINOVIS (176), DEGEN (177), MUSHINE (178) und ZELIGMAN (179) die Behandlung von Ganglien und Synovial-Cysten mit Hyaluronidase durchgesetzt zu haben.

Die Lungenheilkunde setzt Hyaluronidase speziell in der Aerosoltherapie ein. Ergebnisse in der Lungentuberkulose-Behandlung veröffentlichen GARBINSKI (180), DUMON (181), BISCHOFF (182), BARBEITO (183), ABELLO (184), BATYCKI (185) und GARBÍNSKI (186). Mit Hyaluronidase behandelten MORAWSKA (187), BROSS (188) und BROSS (189) das Pleuraempyem. Zum Weiteren erfolgte die Anwendung in der Silikosebehandlung bei DAVID (190) und ROMBOLA (191), sowie bei Bronchialasthma nach HAJOS (192, 193) und bei Pneumonie nach FRIEDRICH (194). Selbst bei Mitralstenose, GENCER (195), und zur Entfaltung der Lunge des Neugeborenen, BLOXSOM (196), wird Hyaluronidase eingesetzt.

Bei der Behandlung von Oedemen aller Art hat Hyaluronidase gute Erfolge gezeigt. Es berichten: CARTAGENOVA (197), FRY (198), SCHWARTZ (199), LOHMEYER (200), MC DANIEL (201), MUFSON (202) und BELLIS (203). Die Elephantiasis konnte JOHANNY (204) günstig beeinflussen.

Die Insulin-Therapie des Diabetes mellitus scheint nach JOST (206), KEUP (207), SCHMIDT (208), VOYER (209), HOLDEN (210), PARGITER (211), TYNDEL (212) und ALEXANDER (213) gleichfalls bessere Erfolge bei der kombinierten Verwendung mit Hyaluronidase zu zeigen. Verhältnismässig wenig Arbeiten erschienen über die Anwendung der Hyluronidase in der Rheuma-Therapie, obgleich man hier auf Grund der günstigen Ergebnisse eine häufigere Anwendung erwarten sollte, lediglich BRAUNER (214) und DESLOUS-PAOLI (215) referieren. Zwei weitere Arbeiten berichten noch über die Anwendung in der Therapie der Poliomyelitis, TACHOWSKÁ (216) und TAYLOR (217).

Verhältnismässig gute Anwendungsmöglichkeiten bietet die Hyaluronidase in der Urologie. Über die Erfolge bei der Behandlung von Nierensteinen veröffentlichen NOWACKI (220), BUTT (221) und DINGLEY (222). Über die Kombinationsbehandlung mit Antibiotica bei Urethritis publiziert KOČVARA (225, 226). Die Behandlung von Blasensteinen mit Hyaluronidase empfehlen SMIDDY (223) und GENOT (224). Weitere Möglichkeiten der urologischen Anwendung stellen BULÍŇSKI (218), BODNER (227), LAURENCE (228) und SELIGER (229) dar.

Eine Zusammenfassung über die therapeutische Anwendung der Hyaluronidase in der Dermatologie bietet RODRIGUEZ (230). Über spezielle Probleme unterrichten BRAUN-FALCO (231) für das Ekzem, JOHANASSON (232), KHMEL'NITSKII (233), WENDELBERGER (234) und SCUTERI (235) für die Sklerodermie, über die Behandlung der Onychomykose NEUMANN (236) und die Therapie der Alopecia areata GOLDBERG (237).

Erfolge bei Harnröhrenstrikturen verzeichneten BAUER (238) und ADERHOLD (239). Scrotalhaematome konnten FIRSTRATER (240), AXLER (241) und PÉREZ COUTÍÑO (242) erfolgreich mit Hyaluronidase behandeln. Paraphimosen therapierten BACHER (243), DOYLE (244) und BAVASTRELLI (245) mit Hyaluronidase. Nach KRIVEC (246) und FANTONI (247) war auch der Priapismus günstig zu beeinflussen. Die Hinzufügung von Hyaluronidase zu Pudem brachte nach DI GIOVAN BATTISTA (248) bessere Heilerfolge.

Auch in der Ophthalmologie haben sich verschiedene Möglichkeiten des Einsatzes von Hyaluronidase geboten. RAIMONDO (249) und ROUHER (250), sowie GONCALVES (251), SELFA (252) und HARTMANN (253) berichten zusammenfassend. NUZZONE (254) diskutiert die Anwendung von Hyaluronidase bei subconjunktivalen Blutungen, JULESZ (255) und LAURENT (256) bei Exophthalmus, sowie MARINCHEV (257) bei intraocularer Druckerhöhung. Die therapeutische Ver-

wendung bei Erkrankungen der Cornea erörtert DYBICKA (258) bei Krankheiten des Glaskörpers PAYRAU (259). Neue Behandlungsmethoden des Trachoms mit Hyaluronidase werden von DINDINA (260) beschrieben. Der Einsatz von Hyaluronidase bei der Staroperation wird von PABST (261), bei der Operation des Cataractes von VERTRUT (262) und bei Pterygium von AGARWALL (263) erörtert.

Die Otologen haben Hyaluronidase bei der Otitis media, ZAOLI (264), bei der Atico-transtympanischen Perfusion, CHECA SAGRA (265) eingesetzt. Eine Zusammenfassung der Hyaluronidaseverwendung in der Otologie gibt TARLE (266).

Nach den umfassenden Sammelreferaten von HENKEL (267) und ANTALOVSKÁ (268) hat sich die Hyaluronidase in der zahnärztlichen Praxis und Klinik bewährt. Chronische Arthropatien des Kiefergelenkes lassen sich laut HOFFMANN-AXT-HELM (269) und KOCHAN (270) mit Hyaluronidase günstig beeinflussen. Bei der Extraktion von eingewachsenen Molaren vermag Hyaluronidase gemäss den Veröffentlichungen von FLEUCHTHAUS (271) und KÁCLOVÁ (272) Vorzügliches zu leisten. Ähnliches berichtet CAROTHERS (273). Selbst Erkrankungen der Geschmacksempfindung sind laut MINARELLI (274) mit Hyaluronidase gut zu beeinflussen.

Diese Auswahl der in den letzten 5 Jahren über die therapeutische Anwendung der Hyaluronidase erschienenen Arbeiten mag veranschaulichen, in welchem Umfang und mit welcher Intensität sich die Hyaluronidase einen Platz im therapeutischen Sektor aller medizinischen Disziplinen geschaffen hat. Sie soll zugleich die Bedeutung unterstreichen, die eine synthetisch gewonnene hyaluronidaseähnliche Substanz in der Pharmakologie erlangen könnte.

Ohne Zweifel sind eine Vielzahl der genannten Indikationen nicht ohne Widerspruch geblieben. Aber wann wäre das in der Medizin je anders gewesen. Alles Neue verlangt, ernsthaft und kritisch geprüft zu werden.

IV. EXPERIMENTELLE PRÜFUNG DES WIRKSTOFFES D.

(Versuchsmethodik, Versuchsergebnisse und Interpretation).

Der Fragestellung entsprechend handelt es sich bei den durchgeführten Experimenten ausschliesslich um vergleichende Untersuchungen. Der Wirkungsgrad des Wirkstoffes D wird bei den einzelnen Versuchsmethoden mit der Wirkung handelsüblicher Hyaluronidasepräparate verglichen. Zum Einsatz kommen das Präparat Kinetin der Firma Schering und das Präparat Luronase der Firma Bayer.

1. EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG ÜBER DIE BEEINFLUSSBARKEIT DER ERYTHROZYTEN-PERMEABILITÄT.

a) Wissenschaftliche Versuchsgrundlagen

Wie ausgeführt, vermag Hyaluronidase die Permeabilität mesenchymaler Gewebe zu verändern. Von der Annahme ausgehend, dass die korpuskulären Bestandteile des Blutes mesenchymaler Herkunft sind, schien es angebracht zu überprüfen, ob die Permeabilität der Erythrozytenmembran durch den Wirkstoff D verändert wird. Es wurde in einer Reihe von 17 Versuchen die Beeinflussung der Aufnahme rate mittels radioaktivem Phosphor (P^{32}) und radioaktivem Kalium (K^{42}) überprüft.

$^{15}P^{32}$ ist ein Radioisotop mit einer Halbwertszeit von 14, 3 d, welches ausschliesslich harte Beta-Strahlen mit einer mittleren Beta-Energie von 0,685 MeV aussendet. HEVESY et al. (66, 67, 68, 69) berichteten erstmals über die Markierung von Erythrozyten mit P^{32} . Diese Markierung wurde an Kaninchen-Erythrozyten vorgenommen. Über Verbesserungen der Methode wird in zahlreichen weiteren Arbeiten u. a. von BROWN et al. (70), GOVAERTS (71), REEVE (72), BAYARD (73) und LAMBRECHTS et al. (74) berichtet. Alle Autoren stellen dabei fest, dass als grundlegende Voraussetzung bei der in vitro-Markierung das Temperaturoptimum von 37° und eine Markierungsdauer von 120 Minuten gegeben sein müssen. Man kann dabei zu einer PO_4 -Aufnahme gelangen, die zwischen 7% und 20% der Plasma-Aktivität liegen, wenn die $Na_2 H P^{32}O_4$ Konzentration 10 Mikrocurie in 0, 1 ml physiologischer NaCl-Lösung auf 8 - 10 ml Cubitalvenenblut entspricht (16). Bei Erhöhung des Plasma-P-Spiegels durch entsprechend grössere Mengen PO_4 ist es möglich, die Aufnahme rate erheblich zu steigern. Nach SCHWAIGER et al. (75) ist für die Markierung menschlicher Erythrozyten die in vitro-Technik gleichfalls als die Methode der Wahl anzusprechen. In der zur Diskussion stehenden Untersuchung war die in vitro-Markierung von der Zielsetzung her indiziert.

In fünf der durchgeführten Versuche wurde die von VETTER-VEALL (17) vorgeschlagene Markierungsmethode verwendet. Heparinblut wird bei 1000 U/m zentrifugiert, das Plasma abpipettiert, die Blutkörperchen in einer Citratlösung nochmals gewaschen, die Waschflüssigkeit wiederum abpipettiert, P^{32} hinzugegeben und bei $37^{\circ}C$ etwa 15 Minuten lang inkubiert. Nach der Inkubierung werden die Zellen nochmals mit einer Lösung, die aus 3 ccm Plasma und 100 ccm Kochsalzlösung besteht, gewaschen. Bei dieser Technik gelingt es nach ROBINSON et al. (76) innerhalb 15 Minuten 90 - 95% des P^{32} in die Erythrozyten zu bringen.

Zum Vergleich wurde in drei weiteren Versuchsserien $K_2^{42}CO_3$ zur Markierung verwendet. Bezüglich der Markierung mit K^{42} fanden SHEPPARD et al. (77), sowie RAKER et al. (78), dass für den Austausch der Aktivität zwischen Serum und Zelle im Prinzip die klassischen Diffusionsgesetze gelten, wie sie für zwei abgeschlossene

Räume, die durch Membranen getrennt sind, allgemeine Gültigkeit haben. Sie ermittelten eine Austauschgeschwindigkeit von 1,8% pro Stunde bei 38°C. DEAN et al. (79) fanden eine mittlere Austauschrate von 1,4% pro Stunde und MULLINS et al. (80) eine solche von 4,4% pro Stunde. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist die K-Konzentration im Erythrozyten bedeutend höher als im Serum (16, S. 553). Eine Erhöhung des Plasmakaliums ist daher von geringer Wirkung. Folglich ist im Vergleich zu P^{32} die K^{42} -Aufnahmerate entsprechend kleiner (78). p_H -Wertänderungen zwischen 7 und 7,7 sind nach RAKER et al. (78) ohne Einfluss auf die Aufnahmerate. Nach MAIZELS (81) liegt die optimale Aufnahmegeschwindigkeit bei p_H 7,4, nach PONDER (82) zwischen 7,4 und 7,6. In diesem p_H -Bereich ist auch der Kaliumverlust auf ein Minimum gesunken. Andererseits ist es im Prinzip möglich, alles intrazelluläre Kalium gegen extrazelluläres Kalium auszutauschen. Voraussetzung ist, dass genügend Energie in Form von Glukose zur Verfügung gestellt wird und das notwendige Konzentrationsgefälle über genügend lange Zeit aufrecht erhalten bleibt.

Das verwendete Kalium hat eine Halbwertszeit von 12,5 h. Es handelt sich um $^{42}_{19}K$ mit einer maximalen Beta-Energie von 3,58 MeV und einer mittleren Gamma-Energie von 1,51 MeV. Die Emission führt über einen angeregten Ca-Kern zum stabilen Ca^{42} .

Die für radioaktive Substanzen massgeblichen Einheiten seien kurz definiert. Unter einem Curie versteht man die Menge radioaktiven Materials, die pro Sekunde $3,700 \times 10^{10}$ Zerfälle aufweist. Demzufolge entspricht 1 Millicurie $3,7 \times 10^7$ und 1 Microcurie $3,7 \times 10^4$ Zerfällen pro Sekunde.

Das radioaktive Material wird von der AERE, Harwell in England bezogen.

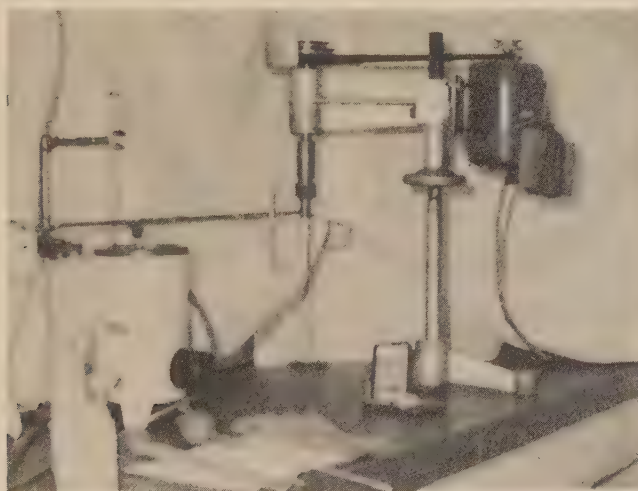
b) Markierungsmethodik:

In 2 Erlenmeyerkolben von 50 ml-Fassungsvermögen werden je Kolben 20 ml Citratblut aus der Cubitalvene gegeben. (In einigen Fällen wurde statt Citratblut heparinisiertes Blut verwendet). Das Verhältnis Blut zu Citrat beträgt 16 : 4, bzw. 0,05 ml Heparinoid zu 19,95 ml Venenblut. Die Erlenmeyerkolben werden beide in ein 37° ($\pm$ 2°)C temperiertes Wasserbad gegeben und während zwei Stunden mechanisch geschüttelt. Beiden Kolben wird eine gleiche Menge $Na_2HP^{32}O_4$ in 1 ml physiologischer NaCl 0,9%ig hinzugefügt. Dieser Zeitpunkt wird als Beginn der Markierung gewertet. Nach 5 Min. Schüttelzeit werden in Kolben 1 der jeweilige Wirkstoff in 1 ml physiologischer NaCl-Lösung gegeben, in Kolben 2, dessen Inhalt als Leerkontrolle den gleichen Bedingungen wie Kolben 1 unterworfen wird, 1 ml physiologische NaCl-Lösung 0,9%ig ohne Wirkstoffzusatz, damit die gleichen Verdünnungsverhältnisse gegeben sind. Die hinzugefügte Aktivität divergiert bei den einzelnen Versuchen von 50 Micro-Curie bis 250 Micro-C für P^{32} und 70 Micro-C bis 287 Micro-C für K^{42} .

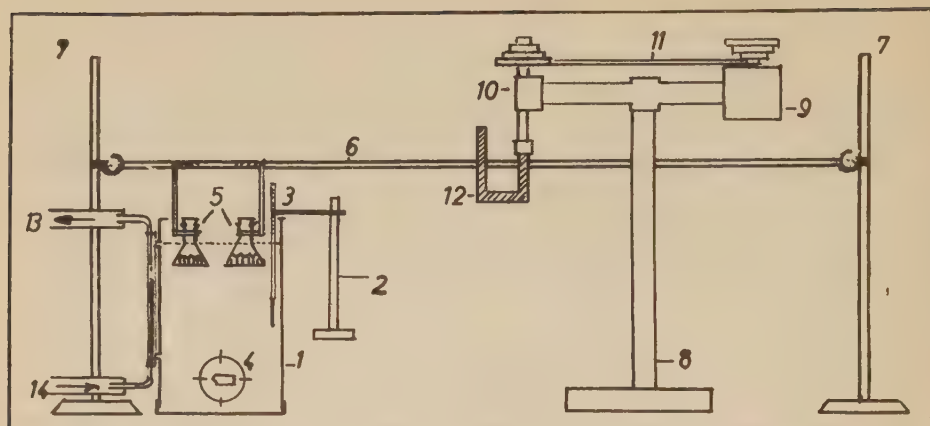
In Zeitabständen von 5, 10, 15, 20, 30, 40, 55, 70, 85, 100 und 120 Min. werden aus beiden Kolben mittels Pipette jeweils 1 ml Gemisch entnommen und zur Messung aufbereitet.

Die Konstanz der Temperatur des Wasserbades wird durch Elektroheizung und Kaltwasserzufuhr aufrechterhalten, da ein Wasserbad mit Thermostat nicht zur Verfügung steht. Die Temperaturkonstanz ist, wie bereits angeführt, für die Aufnahme in vitro sehr wesentlich. Nach EGE, R. (16) dringen bei 30° nur geringe Mengen von P^{32} in Erythrozyten ein. Bei 37° etwa 16 - 29 mal mehr. In den durchgeführten Vorversuchen ergaben Temperaturschwankungen von $\pm 5^\circ$ schon erhebliche Störungen in der gleichmässigen Aufnahme und damit eine deutliche Divergenz des Kurvenverlaufes.

Der gleichmässige mechanische Schüttel-effekt wird durch eine einfache, aber wirkungsvolle "Schüttelvorrichtung" erzielt.



Schemazeichnung der Schüttelvorrichtung:



Erläuterungen:

- | | |
|-----------------------------|--------------------------------|
| 1 Wasserbad | 8 Ständer für Motor |
| 2 Stativ | 9 Motor mit Stufenscheibe |
| 3 Thermometer | 10 Antriebswelle m. Stufensch. |
| 4 Stufenschaltung z. Temp. | 11 Keilriemen |
| 5 Erlenmeyerkolben 1+2 | 12 Schlagarm |
| 6 Vollgummiseil 10 mm | 13 Absaugrohr |
| 7 Verankerungsstative für 6 | 14 Kaltwasserzufuhr |

Beschreibung der Schüttelmaschinerie:

Zwischen zwei schweren Stativen wird ein Gummiseil von 10 mm $\varnothing$ und 1 m Länge straff gespannt. Mittels verzinktem Eisendraht von 1,5 mm $\varnothing$ werden beide Erlenmeyerkolben am Gummiseil drehungsfrei so befestigt, dass sie bis zur reichlichen Hälfte in das Wasserbad ragen. Eine alte Stativbohrmaschine wird soweit untergesetzt, dass eine Umdrehungszahl von 240 pro Minute an der Antriebswelle erreicht wird. Anstelle des Bohrers wird ein Schlagarm befestigt. Die Bohrmaschine wird so justiert, dass der Schlagdarm bei jeder Umdrehung an das Gummiseil schlägt. Der Anschlag erfolgt tunlichst in der Mitte zwischen beiden Stativen. Durch entsprechende Stellung erreicht man eine mittlere Amplitude von 20 mm, das entspricht einer mittleren Amplitude der Erlenmeyer-Kolben von 10 mm in horizontaler Richtung. Bei jedem Anschlag versucht das Gummiseil horizontal und vertikal auszuweichen. Es entsteht so eine kreisförmige Bewegung, die durch das Nach-

schwingen des Gummiseils bis zum nächsten Anschlag des Schlagarmes anhält. Die verdrehungsfrei befestigten Erlenmeyer-Kolben werden dabei je nach Entfernung vom Anschlagspunkt und Stärke des Anschlags in eine verschieden starke, kreisförmige Schüttelbewegung versetzt.

Der Schütteleffekt wurde bei allen Versuchsserien durch gleiche Justierung der Erlenmeyerkolben und der Schüttelmaschine übereinstimmend gehalten.

c) Aufbereitung der Messproben:

Sofort nach Entnahme mittels Pipette und Saugballen werden beide Messproben dreimal mit jeweils 5 ccm auf 37° temperierte physiologische NaCl Lösung 0,9%ig bei 1500 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten lang mittels Zentrifuge gewaschen. Die Waschflüssigkeit und das Plasma werden jeweils abpipettiert und 1 ccm der Gesamtwaschflüssigkeit zur Messung in das Messröhrchen einpipettiert. Die verbleibenden gewaschenen Erythrozyten werden nach der 3. Waschung mit 2 ccm aqua destillata hämolysiert. 1 ccm Hämolysat wird im Messröhrchen zur Messung bereitgestellt. Mit allen 24 entnommenen Materialproben wird so verfahren.

Zu jeder Pipettierung wird jeweils 1 frische und trockene Pipette benutzt. Um Fehlerquellen zu vermeiden, wird in jedem Falle bei der Pipettierung der gleiche Modus eingehalten, d. h. die Flüssigkeit wird mittels Saugballen bis zur 1 ml-Markierung aufgezogen und langsam in Zentrifugen- oder Messröhrchen ausgedrückt. Die Pipette wird noch 2 mal durchgeblasen.

Alle Pipetten und sonst noch verwendeten Glasgefäße werden nach jeder Versuchsserie und Reinigung für 36 Stunden im Phosphatpuffer neutralisiert. Alle Versuche werden, da es sich besonders bei Kalium um erhebliche Aktivitäten handelt, unter Beachtung strengster Strahlenschutzkautele durchgeführt.

d) Methodik der Messung:

Die zu messenden Flüssigkeitsproben von 1 ml werden in Messröhrchen von gleichem Ø mittels Vollpipette eingemessen. Die Leerwerte der Messröhrchen werden vorher ermittelt. Als Messgeräte werden in folgender Anordnung und Schaltung benutzt:

A) Bohrlochkristall Nr. D 670 PW 4111

gekoppelt mit

B) Hochspannungsgerät: Verstärker PW 422

Hochspannung grob Stufe 3)

) entspricht 870 V

dto. fein Stufe 9)

C) Preset Count/Time PW 4052

Preset Count: free

D) Elektronisches Zählgerät PW 4032

Abschwächer: mal 4

Sämtliche Geräte stammen von der Firma Philipps. Die Schaltung der Messzeit erfolgte von Hand über jeweils 10 Minuten. Vor Messbeginn wurde in jedem Fall eine Anwärmzeit des Gerätes von 60 Minuten eingehalten.

Es bestanden keine Bedenken, eventuelle Korrekturen, die durch die Dicke der Flüssigkeitssäule bedingt sein könnten, zu vernachlässigen. Die Beta-Strahlung von P^{32} und K^{42} ist so energiereich, dass der Korrekturfaktor verschwindend klein würde. Voraussetzung für diese Verfahrensweise ist jedoch, dass gleiche Mengen in gleichen Behältern, also gleicher Schichtdicke, gemessen werden (16, S. 563).

e) Versuchsergebnisse:

Für die Markierung der Erythrozyten nach Methode 1 mit zwei Stunden Schüttelzeit sind die Ergebnisse aller 14 Versuchsreihen in Tabelle 4 zusammengefasst. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nicht sämtliche Versuchsprotokolle wiedergegeben. Die Tabellen 1 bis 3 geben drei Beispiele der angewandten Protokollierungsform wieder. In Tabelle 4 wurden die für die Berechnung massgebenden Anfangs- und Endwerte zusammengefasst. Die Impulszahlen sind in $J/1' \times 10^3$ angegeben.

Für die technischerische Auswertung der gewonnenen Ergebnisse liegen folgende Überlegungen zugrunde.

1. Hämolysat: Nach Aufbereitung der Messprobe befinden sich noch 0,5 ml Erythrozytensuspension im Zentrifugenröhrchen. Diese werden mit 2 ml aqua destillata hämolysiert. Damit befinden sich die hämolysierten Erythrozyten in einer Gesamtflüssigkeitsmenge von 2,5 ml. Ein ml davon wird ausgemessen. Um die reelle Gesamtaktivität der Erythrozyten von 1 ml Vollblut zu errechnen, muss das gemessene Ergebnis mit 2,5 multipliziert werden.

2. Waschflüssigkeit: Nach Entnahme aus der Gesamtversuchsmenge wird jeder ml Vollblut zwei Mal mit jeweils 5 ml NaCl 0,9%ig gewaschen. Die überstehende Flüssigkeitssäule wird in einer Menge von jeweils 5 ml abpipettiert. Nach dem zweiten Waschen wird scharf zentrifugiert und es lassen sich dann ohne Schwierigkeit 5,5 ml NaCl-Plasma-Gemisch abpipettieren. Insgesamt werden somit 10,5 ml NaCl-Plasma-Gemisch bei der Aufbereitung der Messproben gewonnen. Ein ml davon wird ausgemessen. Das Messergebnis ist mit 10,5 zu multiplizieren, um die Gesamtaktivität der Waschflüssigkeit zu erhalten.

3. Prozentuale Aufnahme: Die Gesamtaktivität pro ml errechnet sich als Summe von Gesamtaktivität Hämolysat plus Gesamtaktivität Waschflüssigkeit. Vergleicht man die Gesamtaktivität von 1 ml Vollblut bei Versuchsbeginn mit der Aktivitäts-

T A B E L L E : 1

Protokollmuster:

VERSUCHSPROTOKOLL

Versuch Nr. 12

Spender: Pat. Gottfried

Datum: 16. 2. 59

Versuchsbeginn: 15,15 Uhr

I = 1 ml Suprarenin 1 : 1000

Versuchsende: 17,00 Uhr

II = 1 ml NaCl 0,9%ig - Zusatz

Isotop: 50 myC P^{32}

Uhrz. d.	x' n.	Nr. d. M.R.	HÄMOLYSAT			WASCHFLÜSS.			Temp. Ktr.
			LW. d. M.R.	Mess- Wert	Diff. - Wert	LW. d. M.R.	Mess- Wert	Diff. - Wert	
Entn.	Beg.	I II	J/1'	J/1'	J/1'	J/1'	J/1'	J/1'	C°
15,15	0	1	1120	11 000	9 980	1200	30 210	29 000	37
15,15	0	2	1220	12 250	11 000	1180	24 340	23 000	37
15,20	5	3	1140	14 230	13 000	1030	25 570	24 500	37,5
15,20	5	4	1250	15 570	14 300	1110	24 780	24 000	37,5
15,25	10	5	1060	19 710	18 500	1080	20 080	19 000	37
15,25	10	6	1060	21 390	20 300	1560	21 250	19 700	37
15,30	15	7	1130	23 050	22 100	1630	20 390	18 700	37
15,30	15	8	1400	26 030	24 500	1800	16 000	14 200	37
15,35	20	9	1360	27 450	26 000	1270	18 010	17 000	37,5
15,35	20	10	2030	28 290	26 000	1160	19 330	18 000	37,5
15,40	25	11	2010	32 370	30 300	1110	19 850	18 500	37,5
15,40	25	12	1450	31 040	29 600	1120	17 730	16 500	37,5
15,50	35	13	1490	36 140	34 700	1130	16 780	15 500	36,5
15,50	35	14	1440	32 840	31 400	1160	17 220	16 000	36,5
16,00	45	15	1130	45 310	44 000	1090	17 520	16 500	37
16,00	45	16	1080	40 020	39 000	1120	16 480	15 300	37
16,15	60	17	1090	53 290	52 000	1150	15 190	14 000	37,5
16,15	60	18	1470	47 150	45 700	1160	14 280	13 000	37,5
16,30	75	19	1050	48 370	50 000	1150	13 210	12 000	38,5
16,30	75	20	1090	54 060	53 000	1180	13 720	12 500	38,5
16,45	90	21	1180	41 210	58 000	1150	13 030	11 800	38
16,45	90	22	1160	53 320	52 000	1120	12 450	11 200	38
17,00	105	23	1090	62 260	61 000	1240	10 620	9 500	37,5
17,00	105	24	1300	64 940	63 500	1260	11 230	10 000	37,5

T A B E L L E : 2

Protokollmuster:

VERSUCHSPROTOKOLL

Versuch Nr. 13

Spender: Pat. Kraus

Datum: 20. 2. 59

Versuchsbeginn: 14,00 Uhr

I = 20 mg Wirkstoff D in 1 ml

Versuchsende: 15,50 Uhr

II = 1 ml NaCl 0,9%ig - Zusatz

Isotop: 50 myC P³²

Uhrz. d.	x' n.	Nr. d.		HÄMOLYSAT			WASCHFLÜSS.			Temp. Ktr. C°
		M.R.		LW. d.	Mess- Wert	Diff. - Wert	LW. d.	Mess- Wert	Diff. - Wert	
Entn.	Beg.	I	II	J/1'	J/1'	J/1'	J/1'	J/1'	J/1'	
14,05	0	1		1190	40440	39000	1130	226420	225000	37,5
14,05	0		2	1280	47440	46000	1200	226040	225000	37,5
14,10	5	3		1070	57800	56500	1090	177160	176000	37,5
14,10	5		4	1140	74100	73000	1180	226040	225000	37,5
14,15	10	5		1210	73560	72500	1090	167260	166000	37,5
14,15	10		6	1170	85660	84500	1230	217960	216500	37,5
14,20	15	7		1310	83400	82000	1270	159000	158000	38
14,20	15		8	1180	113050	113000	1090	210400	209000	38
14,25	20	9		1130	95300	94000	1120	169630	168000	37,5
14,25	20		10	1160	114160	113000	1110	242200	241000	37,5
14,30	25	11		1200	118540	117500	1150	180100	179000	37
14,30	25		12	1070	134850	133500	1150	217360	216000	37
14,40	35	13		1200	142180	141000	1040	152040	151000	36,5
14,40	35		14	1210	143580	141500	1110	195000	194000	36,5
14,50	45	15		1110	154400	153000	1120	154320	153000	39
14,50	45		16	1210	195020	194000	1170	171240	170000	39
15,05	60	17		1400	215420	214000	1170	140700	139500	36,5
15,05	60		18	1150	218920	217500	1150	197660	196500	36,5
15,20	75	19		1190	220450	219000	1100	166000	165000	37
15,20	75		20	1110	290000	289000	1300	200000	198500	37
15,35	90	21		1300	238020	236500	1060	142740	141500	37
15,35	90		22	1160	265560	264500	1140	152780	151500	37
15,50	105	23		1230	278940	277500	1110	128100	127000	37
15,50	105		24	1330	295280	294000	1160	174000	173000	37

T A B E L L E : 3

Protokollmuster:

VERSUCHSPROTOKOLL

Versuch Nr. 15

Spender: Pat. Kroker

Datum: 9. 4. 59

Versuchsbeginn: 17,00 Uhr

I = 10 mg Wirkstoff D in 1 ml

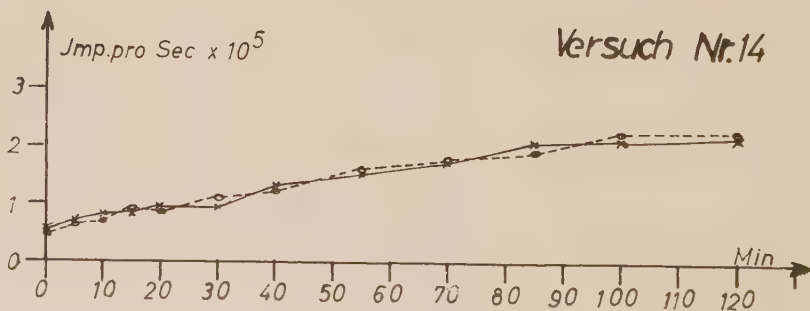
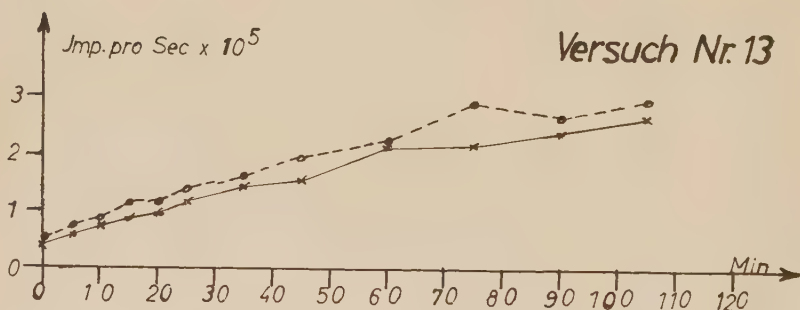
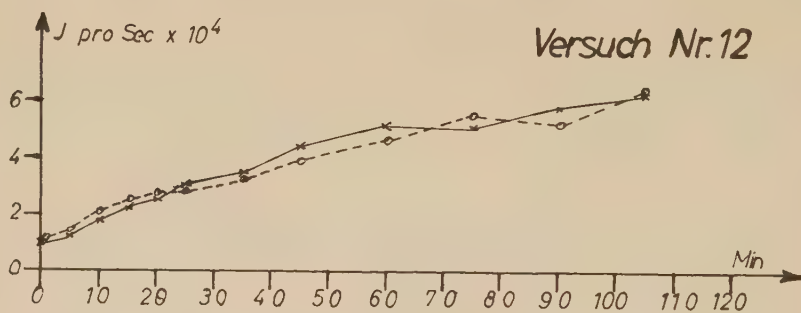
Versuchsende: 19,15 Uhr

II = 1 ml NaCl 0,9%ig - Zusatz

Isotop: 287 myC K⁴²

Uhrz. d.	x'	Nr.d. M.R.	HÄMOLYSAT			WASCHFLÜSS.			Temp.
			LW.d.	Mess-	Diff.-	LW.d.	Mess-	Diff.-	
Entn.	Beg.	I II	M.R.	Wert	Wert	M.R.	Wert	Wert	Ktr.
			J/1'	J/1'	J/1'	J/1'	J/1'	J/1'	C°
17,15	0	1	950	55340	54500	870	971170	970000	37,5
17,15	0	2	940	53480	52600	890	1.088470	1.088000	37,5
17,20	5	3	920	74030	73000	950	997470	996500	35
17,20	5	4	900	65790	64900	810	1.039160	1.038500	35
17,25	10	5	840	80700	79800	1030	1.007130	1.006000	37,5
17,25	10	6	900	79890	79000	1040	1.086370	1.085000	37,5
17,30	15	7	880	85700	85000	1020	1.014380	1.013000	37
17,30	15	8	1090	88690	87500	860	1.037640	1.037000	37
17,35	20	9	980	94120	93200	1030	1.002530	1.001500	38
17,35	20	10	840	89570	88700	850	993630	993000	38
17,45	30	11	1020	94130	93100	800	963450	962500	37,5
17,45	30	12	910	112000	111000	1050	947330	946000	37,5
17,55	40	13	820	131630	131000	1080	924920	924000	37,5
17,55	40	14	990	129740	128800	1010	956780	955700	37,5
18,10	55	15	950	158380	157500	1040	974260	973000	37
18,10	55	16	860	159840	159000	910	849400	848500	37
18,25	70	17	930	171720	170800	890	844710	844000	38
18,25	70	18	980	178330	177500	1030	989770	988700	38
18,40	85	19	970	210670	209800	1020	995120	994000	39,5
18,40	85	20	940	197540	196700	1090	914420	913500	39,5
18,55	100	21	900	214770	213800	1040	935570	934500	37
18,55	100	22	930	222710	221800	890	1.001280	1.000000	37
19,15	120	23	860	220740	219800	1000	925000	924000	38
19,15	120	24	890	227140	226200	860	932300	932000	38

Die den vorstehend wiedergegebenen Versuchsprotokollen entsprechenden Kurven sind in folgenden drei graphischen Bildern dargestellt.



Häm.mit Wirkst. —x—x—x—

Häm.ohne Wirkst. —o—o—o—

TABELLE : 4

Tabellarische Übersicht der Versuchsergebnisse:

Sämtliche Impulszahlungen sind in $x \text{ mal } 10^3$ angegeben.

Abkürzungen: Sup. = Suprarenin Kin. = Kinetin
D = Wirkstoff D

V. Nr.	Iso-top	Wirkstoff	Mit Wirkstoff				Ohne Wirkstoff			
			Hämolysat		Waschflüssigk.		Hämolysat		Waschflüssigk.	
			Beginn	Ende	Beginn	Ende	Beginn	Ende	Beginn	Ende
			J/1'	J/1'	J/1'	J/1'	J/1'	J/1'	J/1'	J/1'
1	P ³²	D	34,9	148,9	80,6	43,7	26,5	102,7	60,4	57,5
2	P ³²	D	16,2	140,5	58,5	39,7	14,7	149,4	61,9	35,6
3	P ³²	D	59,4	121,6	45,3	14,4	23,9	81,5	40,6	30,0
4	P ³²	D	111,0	707,0	545,1	501,0	170,5	684,2	531,7	384,0
5	P ³²	D	110,6	451,8	305,7	182,8	123,1	472,0	282,1	158,2
6	P ³²	Kin.	145,4	506,2	240,0	108,5	126,7	492,8	245,8	98,3
7	P ³²	Sup.	274,5	610,5	329,0	118,3	281,7	560,0	315,0	95,2
8	P ³²	Kin.	18,3	167,5	63,5	33,5	16,0	143,5	55,0	29,0
9	P ³²	Sup.	13,0	61,0	24,5	9,5	14,3	63,5	23,6	10,0
10	P ³²	D	39,0	277,5	225,0	127,0	46,0	294,0	225,0	173,0
11	P ³²	D	247,0	551,0	352,0	205,0	233,0	539,0	330,0	213,0
12	K ⁴²	D	54,5	219,8	971,2	924,0	52,6	226,2	1088,5	932,0
13	K ⁴²	Kin.	37,0	175,8	521,3	571,0	93,0	154,2	466,6	444,5
14	K ⁴²	Sup.	53,0	191,0	1082,0	922,0	58,0	200,5	1125,0	1048,0

Der Zeitpunkt Beginn entspricht der Entnahme des aktivierten Blutes nach 5' Schüttelzeit ohne Wirkstoffsubstanz.

aufnahme der Erythrozyten bei Versuchsende, so lässt sich die prozentuale Aktivitätsaufnahme bestimmen. Dies ist jeweils getrennt für die einzelnen Versuchsgruppen mit und ohne Wirkstoff durchgeführt worden. Tabelle 5 zeigt die errechneten Ergebnisse.

Da in jeder Versuchsreihe beide Versuchsgruppen die gleiche Aktivität in der gleichen Konzentration Phosphorionen zugefügt erhalten, ist es möglich, die jeweilige prozentuale Aufnahme jeder Versuchsreihe und innerhalb der einzelnen Versuchsreihen die relative prozentuale Abweichung der Versuchsgruppen mit und ohne Wirkstoff zu bestimmen. Diese Werte sind in Tabelle 5 als relative Differenz ausgewie-

T A B E L L E : 5

Vers. Nr.	Wirkstoff	Menge i. mg	Isotop	Menge i. mvO	Aufnahme i. % m. W.	Aufnahme rel. i. % o. W.	rel. Diff.	x)
1	D	1	P ³²	250	29,3	31,13	-1,83	-6,22
2	D	10	P ³²	50	55,5	55,75	-0,25	-0,45
3	D	10	P ³²	50	50,5	53,0	-2,5	-4,95
4	D	10	P ³²	50	28,3	27,4	+0,9	+3,18
5	D	10	P ³²	100	37,25	37,5	-0,25	-0,673
6	Kin.	150	P ³²	50	45,25	44,7	+0,55	+1,215
7	Sup.	1 ml	P ³²	50	38,25	39,85	-1,6	-4,17
8	Kin.	75	P ³²	250	23,5	23,5	± 0	± 0
9	Sup.	1 ml	P ³²	50	55,0	58,0	-3,0	-5,48
10	D	20	P ³²	50	29,4	30,25	-0,85	-2,9
11	D	20	P ³²	100	31,0	33,0	-2,0	-6,9
12	D	10	K ⁴²	287	5,35	5,15	+0,2	+3,76
13	Kin.	75	K ⁴²	122	5,37	5,22	+0,15	+2,81
14	Sup.	1 ml	K ⁴²	70	2,84	2,86	-0,02	-0,705
						14 m =	14,10	43,413
						m =	1,007	3,101

x) = Setzt man die prozentuale Aufnahme mit Wirkstoff = 100 % und bezieht die relative Differenz auf die prozentuale Aufnahme mit Wirkstoff, so ergibt sich die prozentuale Abweichung von der Aufnahme mit Wirkstoff. Diese ist in Tabelle 5, letzte Spalte, ausgewiesen.

m rel. Diff. gibt den Durchschnittswert der prozentualen Abweichung bezogen auf die Ges. Aktivität an.

sen. Durch Addition der so gefundenen 14 Werte und Division der erhaltenen Summe durch 14 erhält man die mittlere relative Abweichung.

4. Mittlere relative prozentuale Abweichung: Somit ist unter mittlerer relativer prozentualer Abweichung derjenige Wert zahlenmässig erfasst, der angibt, um wieviel Prozent der Gesamtaktivität die Aktivitätsaufnahme der Erythrozyten beider Versuchsgruppen mit und ohne Wirkstoff im Mittel von einander abweichen.

Von Interesse scheint es, die relative prozentuale Abweichung als Prozentwert der prozentualen Aufnahme der Gruppe mit Wirkstoff auszudrücken. (In Tabelle 5 als Spalte x bezeichnet). Als Mittelwert ergibt sich eine Zahl, die ein eindeutiges Kriterium für die Erhöhung oder Erniedrigung der Membranpermeabilität des Erythrozyten darstellt.

Nach dem üblichen Modus für die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes und der mittleren Streuung werden die diesbezüglichen Werte x , $x-m$, $(x-m)^2$ und s (s steht aus drucktechnischen Gründen für sigma) berechnet. Tabelle 6 zeigt die gefundenen Ergebnisse. Es sind ausserdem in dieser Tabelle die Werte für x/s wiedergegeben. x/s gibt an, wie oft die relative prozentuale Abweichung der Versuchsgruppen mit und ohne Wirkstoff die mittlere Fehlerbreite beinhaltet. Dieser Wert stellt somit ein deutliches Mass dafür dar, ob eine echte Veränderung in der Permeabilität der Erythrozytenmembran oder in der Intensität der Stoffwechselvorgänge der Zelle selbst durch die einzelnen Wirkstoffkomponenten eingetreten ist.

In Tabelle 7, 8 und 9 sind die gleichen Werte wie in Tabelle 6 getrennt nach den einzelnen Wirkstoffgruppen berechnet, in Tabelle 7 für Wirkstoff D, in Tabelle 8 für Kinetin und in Tabelle 9 für Suprarenin.

f) Kritische Würdigung der Versuchsergebnisse:

1. Nach Tabelle 5 schwanken die Werte für die prozentuale Aufnahme bei P 32 mit Wirkstoff zwischen Maximum 55,5 %, Minimum 23,5 %, im Mittel 38,45% und ohne Wirkstoff Maximum 58,0 %, Minimum 23,5 %, im Mittel 39,45 %. Für K⁴² mit Wirkstoff ergeben sich Werte von Maximum 5,37 %, Minimum 2,84 %, im Mittel 4,52 % und ohne Wirkstoff Maximum 5,22 %, Minimum 2,86 %, im Mittel 4,41 %.

Die Gruppe mit Wirkstoff zeigt im Vergleich mit der Gruppe ohne Wirkstoff bei P³² in 8 Fällen eine niedrigere und in 2 Fällen eine höhere Aktivitätsaufnahme; in einem Fall war zwischen beiden Gruppen kein Unterschied vorhanden. Bei K⁴² zeigte die Gruppe mit Wirkstoff zwei Mal Erhöhung und ein Mal Erniedrigung der prozentualen Aktivitätsaufnahme der Gruppe ohne Wirkstoff.

Die Schwankung der prozentualen Aufnahme ist durch die verschiedene Konzentration von Phosphorionen im Plasma bedingt. Wie auf Seite 23 ausgeführt ist, hat bei

T A B E L L E : 6

Berechnung von s^+ und x/s

V. Nr.	Wirk. stMg	Wirk- stoff	Mark. Mg mit	Mg myC	Mark Dauer	%-Auf m.	%-Auf Wst. o. Wst.	x=%- Abw.	x-m	(x-m) ²	x/s
1	1	D	P ³²	250	90	29,3	31,13	1,83	0,82	0,677	6,08
2	10	D	P ³²	50	100	55,5	55,75	0,25	0,76	0,573	0,83
3	10	D	P ³²	50	120	50,5	53,0	2,5	1,49	2,22	8,3
4	10	D	P ³²	50	120	28,3	27,4	0,9	0,11	0,012	2,98
5	10	D	P ³²	100	105	37,25	37,50	0,25	0,76	0,573	0,83
6	150	Kin.	P ³²	50	105	45,25	44,7	0,55	0,46	0,209	1,83
7	1	Sup.	P ³²	50	105	38,25	39,85	1,6	0,59	0,352	5,31
8	75	Kin.	P ³²	250	105	23,5	23,5	0	1,01	1,014	0
9	1	Sup.	P ³²	50	105	55	58,0	3,0	1,99	3,97	9,95
10	20	D	P ³²	50	130	29,4	30,25	0,85	0,16	0,025	2,83
11	20	D	P ³²	100	120	31	33	2,0	0,99	0,986	6,64
12	10	D	K ⁴²	287	120	5,35	5,15	0,2	0,81	0,651	0,66
13	75	Kin.	K ⁴²	122	120	5,37	5,22	0,15	0,86	0,735	0,498
14	1	Sup.	K ⁴²	70	120	2,84	2,86	0,02	0,99	0,976	0,066

14 m	14,10	14s ²	12,962
m	1,007	s	0,304

$$s = \sqrt{\frac{(x_1 - m)^2 + \dots + (x_n - m)^2}{n}}$$

$$s = \sqrt{\frac{0,565 + 0,529 + \dots + 0,967}{14}}$$

$$s = \sqrt{\frac{12,962}{14}}$$

s = Sigma

D Menge in mg

Kin. Menge in IE

Sup. Menge in ml 1:1000

T A B E L L E : 7

Berechnung für Wirkstoff D

VersNr.	x=% Ab	x-m	$(x-m)^2$	x/s
1	1,83	0,733	0,5373	2,57
2	0,25	0,847	0,7174	0,352
3	2,5	1,413	1,9882	3,52
4	0,9	0,197	0,0388	1,265
5	0,25	0,847	0,7174	0,352
10	0,85	0,247	0,0611	1,19
11	2,0	0,913	0,8336	2,82
12	0,2	0,897	0,8046	0,282
8 m =	8,78	$8s^2 =$	5,6984	$ms_D = 1,54$
m =	1,097	s =	0,7123	

T A B E L L E : 8

Berechnung für Kinetin

VersNr.	x=% Ab	x-m	$(x-m)^2$	x/s
6	0,55	0,317	0,1005	23,8
8	0,0	0,233	0,0543	0
13	0,15	0,083	0,0068	6,61
3 m =	0,70	$3s^2 =$	0,1616	$ms_K = 10,1$
m =	0,233	s =	0,0232	

T A B E L L E : 9

Berechnung für Suprarenin

VersNr.	x=% Ab	x-m	$(x-m)^2$	x/s
7	1,6	0,06	0,0036	1,331
9	3,0	1,46	2,131	2,49
14	0,02	1,52	2,310	0,0166
3 m =	4,62	$3s^2 =$	4,4446	$ms_S = 1,2759$
m =	1,54	s =	1,209	

Phosphor eine erhöhte Plasmakonzentration eine erhöhte Aufnahme zur Folge. Als Markierungsmaterial standen bei den vorliegenden Versuchen, durch die umständliche und kostspielige Beschaffung bedingt, immer nur Ausgangsmaterialien verschiedener Aktivität zur Verfügung. Dadurch ergab sich nach Ablauf grösserer Zerfallszeiten die Notwendigkeit, grössere Mengen von P-Ionen zu inkubieren, damit die notwendige und bei jedem Versuch annähernd gleiche Aktivitätsmenge erreicht wurde. Dadurch handelte sich zwangsläufig die entsprechende Serumkonzentration von Versuch zu Versuch. Die jeweils notwendige Phosphorkonzentration wurde unter Berücksichtigung der Gesamtaktivität der Isotopenlieferung am Lieferungstage, der semilogarithmisch aufgetragenen HWZ-Kurve und den erfolgten Entnahmen bestimmt.

Für Kalium ist die Plasmakonzentration von geringerer Bedeutung. Die Erythrozyten besitzen eine verhältnismässig hohe Kalium-Konzentration. Deshalb kann sich der Kalium-Gehalt im umgebenden Milieu nur geringfügig auswirken.

Allgemein betrachtet wurden bei der Durchführung der Versuche alle unter IV, 1, a) dargestellten und aus der Literatur wiedergegebenen Versuchsabläufe bestätigt gefunden. Die Temperatur, die Markierungsdauer, die Gesamtaktivität, die Plasma-Konzentration und die Art des verwendeten Isotopen-Materials spielten für die gewonnenen Versuchsergebnisse die von den Autoren beschriebene Rolle. Die optimalen Versuchsbedingungen wurden durch mehrere Vorversuche ermittelt.

2. Prozentuale Abweichung:

- a) P^{32} : Die prozentuale Abweichung beträgt maximal 3,0 %, minimal 0 % und im Mittel 1,248%.
- b) K^{42} : Die prozentuale Abweichung beträgt maximal 0,2%, minimal 0,02% und im Mittel 0,123%.
- c) Bezieht man die mittlere prozentuale Abweichung auf die prozentuale Aufnahme der Gruppe mit Wirkstoff, so erhält man Werte die im Maximum bei 6,9 %, im Minimum bei 0 % und im Mittel bei 3,1 % liegen.

Nach SCHMEISER (16) und verschiedenen anderen Autoren beträgt die mittlere Fehlergrenze bei derartigen Vergleichsversuchen $\pm 5\%$. Diese Streubreite wäre somit innerhalb der Versuchsreihe in zwei Fällen geringfügig überschritten. Im Gesamtbild ergibt sich kein Anhalt für eine reelle Aufnahmedifferenz.

3. Mittelwert und mittlere Streubreite: Setzt man die gewonnenen Werte entsprechend den Gesetzmässigkeiten für die Errechnung des arithmetischen Mittelwertes (m) und der mittleren Streuung ($s = \sigma$) zueinander in Beziehung, so ergibt sich bei der Gesamtbetrachtung aller Versuchsreihen ein Mittelwert der relativen prozentualen Abweichung von $m = 1,007$ und eine mittlere Streuung von $s = 0,304$. Um die Frage zu beantworten, ob ein reeller Unterschied der Aktivitätsaufnahme zwischen den Gruppen mit und ohne Wirkstoff vorliegt, setzt man

s in Beziehung zur relativen prozentualen Abweichung (x). Der Wert x/s zeigt nach den gebräuchlichen empirischen Methoden dann einen signifikanten Unterschied an, wenn er mindestens ± 2 beträgt. Bei der Betrachtung der in Tabelle 6 wiedergegebenen Werte tritt dieser Fall unter 14 Werten 4 Mal auf. Von diesen 4 Werten sind zwei geringfügig und zwei erheblich. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass bei den durchgeführten Versuchsreihen keine deutliche Erhöhung oder Erniedrigung der Aufnahme von Phosphor bzw. Kalium in den Gruppen mit Wirkstoff gegenüber den Gruppen ohne Wirkstoff vorhanden ist.

4. Aufschlüsselung nach Wirkstoffgruppen: Der Fragestellung entsprechend scheint es wichtig, den arithmetischen Mittelwert (m), die mittlere Streuung (s), das Verhältnis x/s und die mittlere Gesamtstreuung (ms_D , ms_K , ms_S) für die einzelnen Wirkstoffgruppen zu ermitteln. Die Tabellen 7 bis 9 geben die Übersicht für die gewonnenen Werte.

In Tabelle 7 finden wir für Wirkstoff D bei Werten von $m=1,097$, $s=0,7123$ und $ms_D=1,54$ insgesamt drei Fälle unter acht, in denen x/s grösser als 2 s ist.

In Tabelle 8 sind die entsprechenden Werte für Kinetin verzeichnet. $m=0,233$, $s=0,0232$ und $ms_K=10,1$. Von drei Werten x/s sind zwei Werte deutlich erhöht. Es liesse sich daraus der Schluss ziehen, dass Kinetin eine reelle Erhöhung der Membranpermeabilität des Erythrozyten bewirkt. Zieht man jedoch den sehr kleinen Wert für $s=0,02$ in Betracht, so stellen weder die relative Abweichung von 0,55% in Versuch 6, noch die relative Abweichung von 0,15% in Versuch 13 eine signifikante Erhöhung der Aufnahme dar.

Die in Tabelle 9 wiedergegebenen Werte für Suprarenin lassen mit $m=1,54$, $s=1,209$ und $ms_S=1,276$ bei einem Wert von x/s über 2 ebenfalls keinen Schluss für eine wirkliche Erhöhung der Membranpermeabilität durch Suprarenin zu. Geht man jedoch von der Überlegung aus, dass Suprarenin eine Steigerung der Stoffwechselvorgänge in Erythrozyten bewirkt, so ist zumindest der Phosphor- und Kaliumstoffwechsel im Versuchszeitraum davon kaum betroffen, zumindest nicht so eindeutig, dass diese biologische Reaktion einen erkennbaren Niederschlag in der Aufnahme des markierten Phosphors bzw. Kaliums gefunden hat.

Unterzieht man die Ergebnisse, die mittels der ersten Markierungsmethode mit P^{32} und K^{42} für alle 3 Wirkstoffgruppen gewonnen wurden, einer kritischen Betrachtung, so ist kein Anhalt für eine deutliche Erhöhung oder Erniedrigung der Membranpermeabilität als Ausdruck des Wirkstoff-Einflusses gegeben.

g) Markierungsmethode 2:

Die in Vetter-Veall (17, S. 258) angegebene Markierungsmethode wurde zusätzlich herangezogen, um die gewonnenen Ergebnisse zu überprüfen. Die Möglichkeit, dass während der 2-stündigen Markierungsdauer bei der eventuell durch Wirkstoff veränderten Erythrozytenmembran die gespeicherte Aktivität wieder in das umgebende Milieu abgegeben wird, blieb offen. Wie auf Seite 23 ausgeführt, wird deshalb eine zweite Art der Markierung mit P^{32} angewendet.

1. Markierung und Versuchsanordnung:

10 ml Cubitalvenenblut werden zentrifugiert, das überstehende Plasma abpipettiert und die verbleibenden Erythrozyten mit 5 ml Puffer bei 1 500 U/min gewaschen. Die Waschflüssigkeit wird abpipettiert, die Erythrozytensuspension mit 25 mC P^{32} in 1/4 ml aktiviert und mit 5 ml Puffer auf eine Gesamtmenge von 10 ml aufgefüllt. Der Inhalt wird mit je 2,5 ml auf 4 Reagenzgläser verteilt. Zu Reagenzglas 1 werden 1/4 ml NaCl 0,9%ig, zu Reagenzglas 2 1/4 ml Wirkstoff D = 5 mg, zu Reagenzglas 3 1/4 ml Kinetin = 30 IE und zu Reagenzglas 4 1/4 ml Luronase = 50 VE gegeben. Nach kurzem Durchschütteln wird jedem Reagenzglas 1 ml entnommen und wie unten beschrieben weiter behandelt. Die restlichen 1,5 ml werden 15 Minuten bei 37° inkubiert. Nach 15 Minuten wird jeder Reihe abermals 1 ml entnommen und wie folgt zur Messung aufbereitet.

Die gewonnenen 8 Versuchsproben werden mit 5 ml Puffer zwei Mal bei 1500 U/min gewaschen. Bei der zweiten Waschung wird zum Schluss kurz scharf bei 4000 U/min zentrifugiert. Die jeweils abpipettierten Waschflüssigkeitsmengen werden genau gemessen. Die verbleibenden Erythrozyten werden mit 2 Tropfen 10%iger Saponinlösung hämolysiert und mit 1/2 ml aqua dest. die Viskosität des Hämolysates verringert. Von Waschflüssigkeit und Hämolysat werden die Messproben (erstere 1 ml, letzteres gesamte Menge) abgefüllt.

2. Messung:

Die gewonnenen Messproben werden wie unter IV, 1, d) gemessen. Die Versuchsergebnisse wie in Tabelle 10 zusammengestellt, protokolliert und ausgewertet.

3. Versuchsergebnisse:

Es wird die prozentuale Aufnahme für jede einzelne Wirkstoffgruppe berechnet. Gleichfalls wird der Aktivitätsverlust in % der Ausgangsaktivität ermittelt. Die prozentuale Aufnahme wird mit diesem Prozentsatz berichtigt. Aus der prozentualen berichtigten Aufnahme wird der Mittelwert ($\bar{m}$) bestimmt. Durch Subtraktion der prozentualen Aufnahme vom Mittelwert (oder umgekehrt) wird die mittlere relative Abweichung ($m-x$) ermittelt. Nach dem angeführten Verfahren auf Seite 33 der Wert für Sigma (s) als Ausdruck der mittleren Streubreite berechnet. Ausserdem wird die Beziehung $m-x/s$ festgestellt. Durch Summierung

T A B E L L E : 10

Protokollbeispiel für Markierungsverfahren
nach Vetter - Veal(13)

I. Beginn

	1/4 ml NaCl		1/4 ml WD=5mg		1/4 ml K=30 IE		1/4 ml L=50 VE	
	Häm.	Waf.	Häm.	Waf.	Häm.	Waf.	Häm.	Waf.
Menge ml		<u>5,0</u> 5,3		<u>5,0</u> 5,2		<u>5,0</u> 5,4		<u>5,0</u> 5,2
MW J/1'	2356	5446	3046	5193	2983	5279	2778	5445
LW J/1'	435	448	396	401	432	478	437	460
DW J/1'	1921	4998	2650	4792	2551	4801	2341	4985

II. Nach 15'

Menge		<u>5,0</u> 5,3		<u>5,0</u> 5,4		<u>5,0</u> 5,15		<u>5,0</u> 5,2
MW J/1'	9243	4329	10556	4516	18220	3803	12214	4000
LW J/1'	416	428	464	440	548	573	431	426
DW J/1'	8827	3901	10092	4076	17672	3230	11783	3574

III. Auswertung

A. Beginn	NaCl	D	K	L
Häm. Beginn	1921	2650	2551	2341
Waf. x Menge	51477	49836	49930	50847
Ges. Akt. p. ml.	53398	52486	52481	53188
<u>B. Ende (nach 15')</u>				
Häm. Ende	8827	10092	17672	11783
Waf. x Menge	40180	42390	32787	36455
Ges. Akt. p. ml.	49007	52482	50459	48238
Akt. Verl. A-B	4391	4	2023	4951
A. V. i. % bez. a/A	8,2%	0,0%	8,2%	9,32%
A: Häm B=% Aufn.	16,4%	18,5%	32,7%	21,9%

Zusammenstellung der Versuchsergebnisse mit Berechnung
nach Markierungsmethodik Vetter - Veall

V. I. Standartfehler				II. Proz. Aufnahme				III. % ber.n.I.				m	
Nr.	NaCl	D	K	L	NaCl	D	K	L	NaCl	D	K	L	
1	15,6	8,15	7,78	1,15	36,5	44,1	43,4	43,9	43,5	48,8	47,3	44,9	46,1
2	8,2	0,0	8,2	9,32	16,4	18,5	32,7	21,9	17,7	18,5	35,4	22,9	23,64
3	17,0	2,3	6,93	4,32	21,6	20,8	28,8	33,1	25,3	21,2	30,5	34,2	27,8
4	11,9	1,2	1,0	1,9	5,9	8,3	7,3	7,8	6,7	8,4	7,3	7,9	7,58
5	0,35	1,97	1,64	12,45	37,0	39,3	41,9	28,6	37,1	40,1	42,6	32,2	38,5

Vers. Nr.	m	s	m-x				x/Sigma			
			NaCl	D	K	L	NaCl	D	K	L
1	46,1	2,05	2,6	2,7	1,2	1,2	1,23	1,30	0,58	0,58
2	23,6	7,54	5,9	5,1	12,7	0,7	0,78	0,68	1,69	0,01
3	27,8	4,95	2,5	6,6	2,7	6,4	0,51	1,32	0,55	1,29
4	7,6	0,24	0,9	0,8	0,3	0,4	3,73	3,38	1,13	1,56
5	38,5	3,93	1,4	1,6	4,1	6,3	0,35	0,4	1,62	1,62

Sa. V. 1-5	6,60	7,08	5,56	5,06
x/s V 1-5	1,32	1,52	1,11	1,01

s steht für Sigma

Konzentrationen: NaCl 1/4 ml
D 5 mg in 1/4 ml
K 30 IE in 1/4 ml
L 50 VE in 1/4 ml (L = Luronase)

T A B E L L E : 11

und Division wird der Durchschnittswert für jede einzelne Wirkstoffgruppe gefunden. Die berechneten Werte sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

4. Kritische Betrachtung der Versuchsergebnisse:

Die mittlere prozentuale Abweichung beträgt im Maximum 12,7 (K, Vers. 2) und im Minimum 0,3. Die durchschnittlichen Werte für $m-x/s$ betragen für die einzelnen Wirkstoffgruppen in keinem Falle mehr als 2. Damit ist auch durch die 2. Markierungsmethodik deutlich erwiesen, dass die in den vorliegenden Versuchsreihen verwendeten Wirkstoffe keine Erhöhung oder Erniedrigung der Erythrozytenmembranpermeabilität bewirken. Zumindest ist keine Veränderung der Permeabilitätsverhältnisse festzustellen, solange keine toxische Konzentration der einzelnen Wirkstoffe vorliegt.

Zugleich ist durch die vorliegenden Versuchsergebnisse erwiesen, dass, bei eventueller therapeutischer Anwendung von Hyaluronidase-Präparaten i. v. keine Schädigung des Erythrozyten eintritt, solange nicht toxische Konzentrationen verwendet werden.

IV. 2. PRÜFUNG DES WIRKSTOFFES D AUF SEINE WIRKUNG ALS SPREADING FAKTOR MITTELS FARBSTOFF

Wie bereits auf Seite 17 schon ausgeführt, ist es möglich, den Wirkungsgrad von Hyaluronidase- oder dieser ähnlichen Präparate daran festzustellen, mit welcher Intensität sie als spreading factor auf das Interstitium einwirken. ELSTER und DORFMANN et al. (276) führten 1949 einen Versuch an Tieren durch, der die i. v. Injektion von Farbstoffen und Testes-Hyaluronidase behandelte. Zusammenfassend stellten sie fest, dass bei der i. v. Injektion von Hyaluronidase und Farbstoff T-1824 bei Ratten Ödeme, schnelle Diffusion des Farbstoffes in die Gewebe der Extremitäten, Nase, Ohren, der Schnauze und der Zunge gefunden werden. Ferner zeigte sich eine Kontraktion der Blutgefäße und in einigen Fällen ein schockähnliches Syndrom. Diese Veränderungen wurden innerhalb von 5 Minuten sichtbar, erreichten ihr Maximum nach 30 - 45 Minuten und waren nach 24 Stunden vollständig abgeklungen. Die Plasmakonzentration von T-1824 wurde durch Zugabe von Hyaluronidase eindeutig verringert. War die Hyaluronidase vorher 30 Minuten lang bei 70°C inaktiviert worden, war sie nicht mehr wirksam. Um auszuschalten, dass es sich um einen Fremdeiweisseffekt handelte, wurden die gleichen Versuche mit Rinderalbumin und Histamin durchgeführt. Es trat unter gleichen Anwendungsbedingungen keine gleichartige Wirkung auf. Darüber hinaus fanden sie, dass sich die betreffenden Organe kälter anfühlten. Duran-Reynals untersuchte die Geschwindigkeit der Diffusion aus dem Blut in das Gewebe mit oder ohne Testesextrakt. Er kam zu ähnlichen Ergebnissen.

In Anlehnung an diese Versuche wurden mehrere Testreihen mit Ratten und Kaninchen durchgeführt, um festzustellen, ob der der Prüfung zu unterziehende Wirkstoff gleiche oder zumindest ähnliche Ergebnisse zeigte.

a) Versuchsdurchführung an Ratten

aa) Versuchsanordnung. 12 Rockefeller-Ratten von ca. 180 g werden in drei Versuchsgruppen á 4 Versuchstiere eingeteilt.

Gruppe 1: erhält in 1/2 ml 5 mg Wirkstoff und 1/2 ml 1%ige Evans-Blau-Lösung in die Schwanzvene injiziert.

Gruppe 2: erhält in 1/2 ml 75 IE Kinetin und 1/2 ml 1%ige Evans-Blau-Lösung in die Schwanzvene injiziert.

Gruppe 3: erhält nur 1/2 ml 1%iges Evans-Blau in die Schwanzvene injiziert.

Die Tiere werden zur Injektion nicht narkotisiert, sondern in laborüblicher Weise festgehalten. Gleichzeitig erfolgt eine entsprechende Kennzeichnung. Anschließend an die Injektion, die bei allen Tieren ohne Schwierigkeiten durchzuführen war, werden sämtliche Tiere unter laufender Beobachtung gehalten. Die Verfärbung von Ohren, Pfoten und Schnauze wird in Zeitabständen von 10, 30, 60 und 90 Minuten, sowie 2, 4, 5, 20, 36 und 48 Stunden festgestellt und protokollarisch erfasst.

ab) Versuchsergebnisse: Die Injektion wurde von allen Versuchstieren gut und ohne schockähnliche Syndrome vertragen. Obgleich auf gute intravasale Applikation geachtet wurde, traten Ödeme und deutliche Abkühlung im Bereich der Injektionsstellen bei den Tieren mit Kinetin und Wirkstoff D auf.

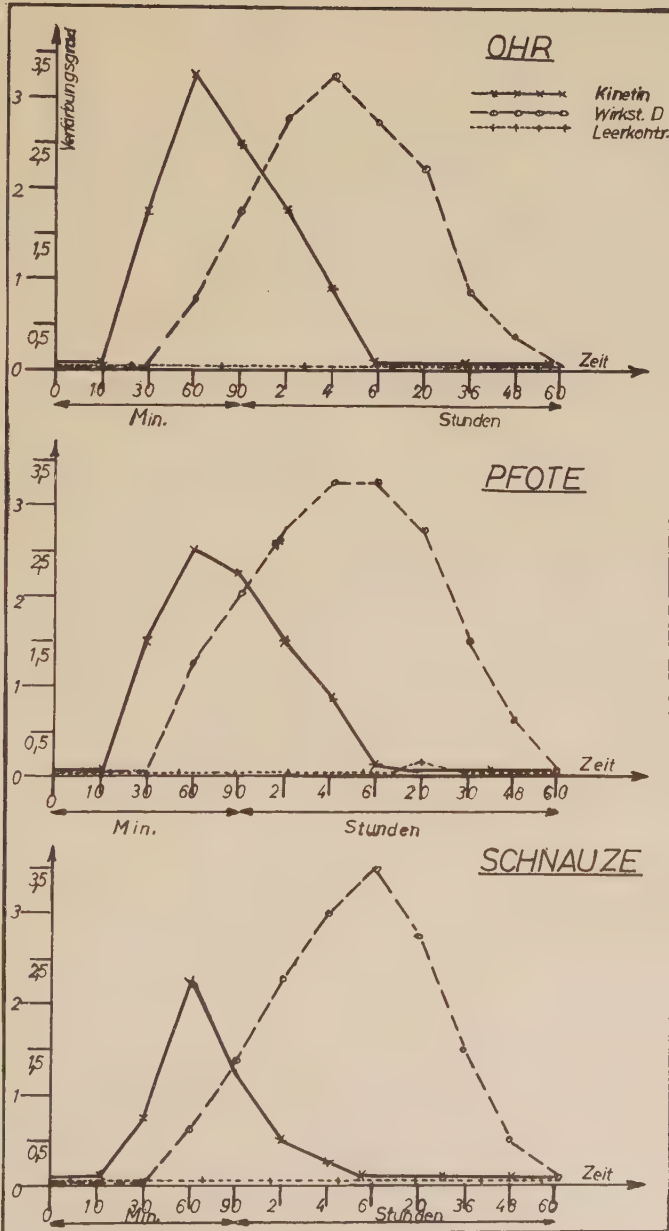
			Minuten post Inj.				Stunden post Inj.						
Gr.	Tier	Zeich	10	30	60	90	2	4	6	20	36	48	60
Kinetin	1	•	∅	+	+++	++	++	+	∅	∅	∅	∅	∅
				++	+++	++	++	++	+	(+)	∅	∅	∅
				+	++	+	+	+	∅	∅			
	2	••	∅	+	++	+++	++	+	∅	(+)	∅	∅	∅
				∅	++	+++	++	+	(+)				
				∅	+	++	(+)	∅	∅				
	3	•••	∅	++	+++	+++	++	+	∅	∅	∅	∅	∅
				+++	+++	+++	+	∅	∅				
				+	++	+	(+)	∅	∅				
	4	••••	∅	+++	+++	++	+	(+)	∅	∅	∅	∅	∅
				+	++	+	+	(+)	∅				
					++	+	∅	∅	∅				
Wirkstoff D	5	—	∅	∅	+	++	+++	+++	++	+++	++	+	∅
					(+)	+++	+++	+++	+++	+++	++	(+)	
					+	++	++	++	++	++	++	+	∅
					+	+	+	+	+	+	+	+	
	6	==	∅	∅	+	++	++	+++	+++	++	(+)	∅	∅
					++	++	++	+++	+++	+++	++	∅	
					+	+	+	++	+++	+++	++	+	
	7	===	∅	∅	(+)	++	+++	+++	++	++	+	∅	∅
					+	++	+++	+++	+++	+++	++	+	
					∅	(+)	+	++	+++	+++	+	∅	
	8	===	∅	∅	(+)	+	++	+++	+++	++	+	(+)	∅
					∅	+	+++	+++	+++	+++	+	+	(+)
					+	++	+++	+++	+++	+++	++	+	(+)
Kontrolle	9	•	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	10	••	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	11	•••	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	12	••••	∅	II	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabellarische Übersicht der Versuchsergebnisse

Verfärbung: ∅ = ohne, (+) = angedeut.; += schwach

++ = deutl; +++ = stark, ++++ = sehr st.

Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse mit Ratten



- ac) 1. **Maximalwerte:** In der Gruppe mit Wst. D tritt die Verfärbung am deutlichsten nach ca. 4 - 5 Stunden auf. In der Gruppe mit Kinetin ist der Höchstwert nach 2 Stunden spätestens erreicht. In der Gruppe ohne Wirkstoff tritt eine Verfärbung angedeutet erstmals nach 20 Stunden auf (276).
2. **Abflutung:** In der Gruppe mit Wst. D setzt die Abflutung zwischen 5 und 20 Stunden ein. Beendet ist sie zwischen 36 und 48 Stunden. In der Gruppe Kinetin beginnt die Abflutung bereits nach 2 Stunden. Beendet ist sie nach 20 Stunden. Die Kontrollgruppe weist zwischen dem 20- und 36-Stundenwert keine deutlichen Unterschiede auf.
3. **Anflutung:** Die ersten Zeichen einer Verfärbung zeigt die Gruppe Wst. D nach 90 Minuten. Die Gruppe mit Kinetin weist bereits nach 60 Minuten, das heisst zwischen 30 und 60 Minuten, eine schwache Verfärbung auf. In der Gruppe ohne Wirkstoff kann man eine solche bestenfalls nach 20 Stunden erkennen (276).

Zusammenfassend lässt sich vergleichend feststellen:

- a) Bei der Gruppe Wirkstoff D tritt die Blauverfärbung gegenüber der Gruppe Kinetin verzögert auf, hält länger an, ist intensiver und klingt langsamer ab.
- b) Die Verfärbung der Gruppe Kinetin flutet schnell an, hält nur über ca. 2 Stunden an und flutet rasch ab.
- c) Die Kontrollgruppe zeigt keine deutliche Blauverfärbung.

b) Versuchsdurchführung an Kaninchen:

Es scheint angebracht, die an den kleineren Tieren gewonnenen Ergebnisse an grösseren Tieren zu überprüfen.

- Aa) Sechs Kaninchen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 3,5 kg werden in 3 Gruppen á 2 Versuchstiere eingeteilt. Es werden wie in Versuch a) jeder Gruppe entsprechende Mengen an Farbstoff und Wirkstoff in die Löffelvene injiziert.

- 1. Gruppe: 1 ml Farbstoff Evans-Blau 1%ig und 10 mg Wirkstoff D in 2 ml NaCl 0,9%ig.
- 2. Gruppe: 1 ml Evans-Blau 1%ig und 150 IE Kinetin in 2 ml NaCl 0,9%ig.
- 3. Gruppe: 1 ml Evans-Blau 1%ig und 2 ml NaCl 0,9%ig.

Die Injektionen waren ohne Schwierigkeit durchzuführen. Die getrennt gegebenen Flüssigkeiten wurden jeweils in der Reihenfolge Farbstoff, Wirkstoff injiziert.

Ab) V Versuchsergebnisse:

Alle 4 Tiere, die Wirkstoffe erhielten, zeigten im Bereich des zur Injektion benutzten Ohres ein ca. 5-DM Stück grosses Ödem. Beide Ohren dieser Tiere fühlten sich während des gesamten Beobachtungszeitraumes deutlich kühler an. Ein Ödem an Augen, Schnauze oder Pfoten wurde nicht beobachtet.

1. **Tabellarische Übersicht der Versuchsergebnisse:**

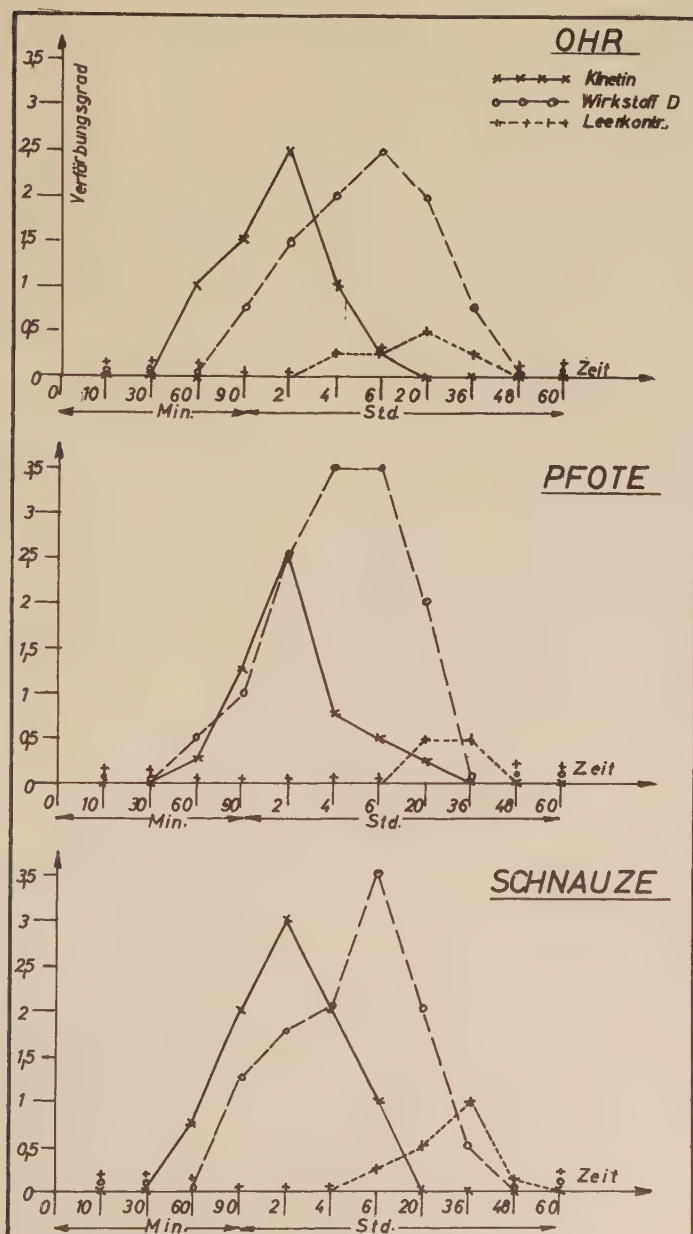
Die Signierung der Versuchsergebnisse entspricht jener in Versuch 2 a, ab).

Tabellarische Übersicht der Versuchsergebnisse bei Kaninchen.
(Reihenfolge: Ohr, Pfote, Schnauze)

Tabelle der Berechnungswerte für die graphische Darstellung:

Organ	10'	30'	60'	90'	2 ^h	4 ^h	6 ^h	20 ^h	36 ^h	48 ^h	60 ^h
K I N E											
Ohr	0	0	1	1,5	2,5	1	0,25	0	0	0	0
Pfote	0	0	0,25	1,25	2,5	0,75	0,5	0,25	0	0	0
Schnauze	0	0	0,75	2	3	2	1	0	0	0	0
W I R K D											
Ohr	0	0	0	0,75	1,5	2	2,5	2	0,75	0	0
Pfote	0	0	0,5	1	2,5	3,5	3,5	2	0	0	0
Schnauze	0	0	0	1,25	1,75	2	3,5	2	0,5	0	0
L E E R K											
Ohr	0	0	0	0	0	0,25	0,25	0,5	0,25	0	0
Pfote	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0	0
Schnauze	0	0	0	0	0	0	0,25	0,5	1	0,12	0

Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse mit Kaninchen.



Ac) Interpretation: Auch bei der graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse mit Kaninchen liegt eine zeitliche Verzerrung der Diagramme vor. Diese entspricht massstabmässig der Darstellung bei Ratten, so dass beim Vergleich beider Diagramme die zeitliche Verzerrung vernachlässigt werden kann. Die Versuchsergebnisse zeigen, wie aus den Tabellen und graphischen Übersichten ersichtlich, eine deutliche Übereinstimmung zwischen der Versuchsreihe Ratten und der Versuchsreihe Kaninchen. Dies bezieht sich sowohl auf die Verfärbungsintensität, als auch auf die Verfärbungsdauer. Die Kinetin-Wirkung setzt deutlich nach ca. 60 Minuten ein und ist nach 6 Stunden nahezu abgeklungen. Wirkstoff D entfaltet seine Hauptwirkung zwischen 90 Minuten und 20 Stunden. Die Kontrollgruppe ohne jegliche Wirkstoffinjektionen liess eine geringe Verfärbung zwischen 20 und 36 Stunden erkennen. Es ist anzunehmen, dass dieses Ergebnis durch eine zu hohe Farbstoffkonzentration (da eine Verfärbung bei beiden Kontrolltieren, wenn auch in verschiedener Stärke auftrat) oder durch eine bereits vor Versuchsbeginn bestehende veränderte Gefässpermeabilität bedingt war.

Fasst man die Ergebnisse der Gruppe IV, 2 "Prüfen des Wirkstoffes i. v. mittels Farbstoff i. v." zusammen, so lässt sich sagen: Wirkstoff D zeigt eine eindeutige Wirkung in Form einer Steigerung der Kapillarpermeabilität. Diese ist in der Maximalintensität der Wirkung von Hyaluronidase nahezu gleich, sofern man etwa, den bisherigen empirischen Ermittlungen entsprechend, wirkungsgleiche Konzentrationen verwendet.

Ein Unterschied besteht vor allem in der Länge der Zeitphase bis zum Wirkungseintritt, der Wirkungskdauer und der Länge des Zeitintervalles für das Abklingen der Wirkung. Wirkstoff D braucht länger, um seinen Effekt voll zu entfalten. Die Wirkung hält länger an und klingt weniger rasch ab.

Ödeme wurden nur im Injektionsbereich beobachtet, an entfernten Körperstellen der Versuchstiere traten sie nicht auf.

Eine Übereinstimmung mit den Versuchen von S. K. ELSTER, FREEMAN, M. E. und DORFMAN, A. (276), sowie S. K. ELSTER, FREEMAN, M. E. und ANDERSON P. R. (277) konnte nur in Bezug auf die Art der Wirkung erzielt werden. Die gefundenen Zeitwerte für An- und Abflutung wie auch Dauer der Verfärbung divergierten bei den in diesem Versuch vorliegenden Farbstoffkonzentrationen und Wirkstoffen gegenüber den von obigen Verfassern publizierten Werten. Gleichfalls besteht eine Divergenz in der Beobachtung von Ödemen. Die gefundenen Ergebnisse vorstehender Versuche lassen den Schluss zu, dass die intravenös gegebenen Wirkstoffe über eine Erhöhung der Kapillarpermeabilität die beobachtete Wirkung entfalten.

B) Farbstoff subcutan (intracutan) und Wirkstoff i. v.

Nachdem die Überprüfung des Wirkstoffes als spreading-factor einer weiteren in Kürze erscheinenden Arbeit von H. W. PABST vorbehalten bleibt, soll hier lediglich die Auswirkung überprüft werden, die die intravenöse Wirkstoff D-Gabe auf die Resorption von intracutan gesetzten Farbstoffquaddeln entfaltet. Ähnliche Versuche wurden in anderem Zusammenhang von MATTHIES, H. (278) durchgeführt.

Ba) Versuchsanordnung: Die Haut zweier Kaninchen (A+B) wird in der Bauchregion in einem kreisförmigen Bezirk von etwa 5 cm Durchmesser sauber und schonend enthaart. Anschliessend erhält Kaninchen A 5 mg Wirkstoff D intravenös durch die Ohrvene. Beiden Kaninchen wird dann eine Quaddel von 1 ml Evans-Blau 0, 1%ig intracutan in die Mitte des enthaarten Hautbezirkes appliziert. Als Kriterium der Wirkung von Wirkstoff D wird die Ausbreitung des Farbstoffes im Gewebe, die Verstreichung der Quaddelkanten und die Veränderung der Überstandshöhe der Quaddel über das normale Hautniveau gewertet. Die Tiere werden, um eine Verfälschung der Versuchsergebnisse durch Muskelarbeit und damit verbundene Veränderung der Durchblutungsverhältnisse zu vermeiden, in geeigneten Behältern ruhig gestellt.

Vergleichsversuche werden mit Kinetin und Luronase intravenös durchgeführt. In gleichen Zeitabständen werden die Veränderungen der Farbstoffquaddeln nach den oben angegebenen Kriterien festgestellt. Eine planimetrische Auswertung, wie sie von Matthies, H. (278) angegeben ist, wurde nicht durchgeführt.

Bb) Versuchsergebnisse: Ohne Zweifel haften den folgenden tabellarisch zusammengestellten Versuchsergebnissen die durch die subjektiven Beobachtungen bedingten Fehlerquellen an.

WIRKSTOFF D.

<u>Mit</u> Wirkstoff		<u>Ohne</u> Wirkstoff	
1° Quaddelgrösse	13 mm		13 mm
Quaddelkanten scharf abgesetzt		dto.	
Quaddelhöhe	6 mm		6 mm
4° beginnende Abflachung	17 mm		13 mm
	4 mm	scharf abgesetzt	6 mm
6°	20 mm		15 mm
flach		gering abgeflacht	
	2 mm		5 mm

10'	24 mm		15 mm
verstrichen		unverändert	
	0 mm		5 mm
15'	30 mm		15 mm
völlig verstrichen		unverändert	
	0 mm		5 mm

KINETIN.

<u>Mit</u> Wirkstoff		<u>Ohne</u> Wirkstoff	
1'	15 mm		12 mm
verstreichend		scharf abgesetzt	
	4 mm		5 mm
4'	20 mm		12 mm
verstrichen		scharf abgesetzt	
	2 mm		5 mm
6'	26 mm		14 mm
völlig verstrichen		etwas abgeflacht	
	0 mm		4 mm
10'	32 mm		15 mm
völlig verstrichen		unverändert	
	0 mm		4 mm
15'	44 mm		14 mm
völlig verstrichen		unverändert	
	0 mm		4 mm

LURONASE.

<u>Mit</u> Wirkstoff (A)		<u>Ohne</u> Wirkstoff (B)	
1'	Quaddelgrösse 12 mm		14 mm
	Quaddelkanten scharf abges.	dto.	
	Quaddelhöhe 5 mm		4 mm
4'	19 mm		14 mm
verstreichend		scharf abgesetzt	
	3 mm		4 mm

6°	22 mm		15 mm
fast verstrichen		gering verstrichen	
	1 mm		3 mm
10°	28 mm		16 mm
verstrichen		unverändert	
	0 mm		3 mm
15°	38 mm		16 mm
verstrichen		unverändert	
	0 mm		3 mm

Bc) Interpretation der Versuchsergebnisse:

Kinetin und Luronase zeigen im Vergleich zu Wirkstoff D eine raschere Ausbreitung des Farbstoffes, wenn der Wirkstoff intravenös und der Farbstoff als Quaddel intracutan gegeben werden. Die gesetzten Quaddeln sind bei Kinetin und Luronase eher verstrichen. Die Unterschiede sind, sowohl was Quaddelhöhe, Verstreichen der Quaddelkanten und Grösse der Farbstoffflecken anbelangt, signifikant.

Wirkstoff D zeigt eine in Bezug auf die Beurteilungsgesichtspunkte deutliche Wirkung, die jedoch im Vergleich mit den anderen Wirkstoffen verzögert eintritt. Die vorhandene Differenz ist gegenüber den Leerkontrollen als reell zu werten.

Die Wirkung darf dahingehend gedeutet werden, dass es durch den Wirkstoff zu einer Depolymerisation der Hyaluronsäure im Bereich der Basalmembran der Gefässe und im Interstitium kommt. Es tritt eine reversible Auflockerung der fibrillären Elemente ein, wodurch die Diffusionsmöglichkeiten gefördert werden. Infolgedessen kommt es zu einer beschleunigten Ausbreitung des Farbstoffes im Gewebe. Die Resorption wird gleichfalls gesteigert.

Insgesamt betrachtet hat Wirkstoff D bei dieser Versuchsreihe eine positive Wirkung.

Bei der Prüfung des Wirkstoffes D auf seine Wirkung als spreading factor mittels Farbstoff ergibt sich zusammenfassend, dass das zu untersuchende Präparat eine deutliche spreading-Wirkung besitzt. Wenn im Rahmen dieser Arbeit auch nur die Auswirkungen des intravenös gegebenen Wirkstoffes überprüft wurden, so lässt sich, vor allem im Hinblick auf Gruppe B, aussagen, dass die spreading steigernde Wirkung nicht die gleiche Intensität wie die biologischer Hyaluronidasepräparate besitzt. Die Wirkung als solche ist jedoch in einem Ausmass gesteigert, dass sich gegenüber den Leerversuchen noch deutlich subjektiv wahrnehmbare Unterschiede ergeben. In allen drei angewandten Versuchsanordnungen

gen ergibt sich diese positive Wirkung des Wirkstoffes D. Es muss weiterhin festgestellt werden, dass der zu untersuchende Wirkstoff, abgesehen von der verzögert eintretenden Wirkung, einen über längere Zeit anhaltenden und langsamer abflutenden Effekt besitzt.

IV. 3. PRÜFUNG MITTELS ELEKTROPHORETOGRAMM, ZUGLEICH ÜBERPRÜFUNG DER VERFLÜSSIGUNGSWIRKUNG VON WIRKSTOFF D

a) Wissenschaftliche Grundlagen

Auf den Erfahrungen von DURAN-REYNALS, CHAIN und DUTHIE, sowie MEYER und Mitarbeiter aufbauend, untersuchten SCHÜRCH und Mitarbeiter (275) die Hyaluronsäure und die Auswirkung der Hyaluronidase auf die Hyaluronsäure elektrophoretisch. Sie fanden, dass Hyaluronsäure in der Elektrophorese als eine der Albuminfraktion vorausseilende Komponente nachweisbar ist. Bei ihren Untersuchungen, die sie bevorzugt an der Synovialflüssigkeit aus Gelenken Kranker mit polyarthrititis rheumatica durchführten, stellten sie eine besonders stark hervortretende Hyaluronsäurezacke fest. Gleichzeitig bemerkten sie, dass die Synovialflüssigkeit dieser Patienten eine sehr hohe Viskosität aufwies. Eine zweite, zwischen der Hyaluronsäure- und der Albumin-Zacke auftretende Veränderung des Elektrophoretogramms (im Vergleich zu normal) entspricht ihrer Ansicht nach wahrscheinlich einem an Eiweiss gebundenen Hyaluronsäureanteil. Sie konnten nachweisen, dass diese zweite Zacke ebenso wie die erste nach Zusatz von Hyaluronidase nicht mehr nachweisbar ist. Ausserdem konstatierten sie, dass Hyaluronsäure sowohl in vitro als auch nach intravitaler Injektion ins Gelenk innerhalb von 2 Tagen völlig verschwindet, wenn man gleichzeitig Hyaluronidase injiziert. Bei Fortsetzung der Untersuchungen war die Hyaluronsäure in vivo nach 9 Tagen wieder vorhanden. In Anlehnung an diese Untersuchung überprüften wir den Wirkstoff D mit ähnlicher Methodik.

b) Versuchsordnung

Da uns Synovialflüssigkeit von Polyarthritikern nicht zur Verfügung stand, verwendeten wir das Pleuraexsudat einer Patientin, die in kürzeren Zeitabständen punktiert werden musste und an einem Pleuramesotheliom erkrankt war. Das gewonnene Punktat war nicht haemorrhagisch, aber hoch viskös. Nach verschiedenen Autoren ist das Exsudat bei Pleuramesotheliom besonders hyaluronsäurereich. Die hohe Viskosität ist als Beweis dafür zu werten.

Ein Teil des Exsudates wird in 12 Portionen á 2 ml aufgeteilt. Zu jeder Portion werden entweder Wirkstoff D oder die zum Vergleich herangezogenen Hyaluronidasepräparate in verschiedener Konzentration in jeweils 1/4 ml Flüssigkeit (NaCl 0,9%ig) zugesetzt.

In Portion 1 - 3 Kinetin in der Konzentration 25, 50 und 100 IE.

In Portion 4 - 6 Luronase in der Konzentration 50, 100 und 200 VE.

In Portion 7 - 9 Wirkstoff D in der Konzentration 1, 2, 5 und 5 mg.

Portion 10 erhält reines Exsudat zum Vergleich.

Portion 11 enthält seines Exsudat + $1/4$ NaCl 0,9%ig.

Portion 12 enthält Exsudat + $1/4$ ml Suprarenin 1:1000.

In Zeitabständen von 10 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden, 15 Stunden, 24 Stunden und 36 Stunden wird der Grad der Verflüssigung überprüft. Zum Ablesen werden die Gläser jeweils geschüttelt und nach dem Schütteln unter gleicher Neigung gegen das Kontrollglas beobachtet. Die Veränderung der Oberflächenspannung und der Vorflusstrecke bei einem bestimmten Neigungswinkel geben ein Kriterium für den Grad der Verflüssigung.

Die für die Überprüfung des elektrophoretischen Verhaltens benötigten Elektrophoresen werden aus dem 1-Stunden-Wert und dem 36-Stunden-Wert der Versuchsreihe gewonnen.

c) Versuchsergebnisse

Für die Verflüssigungswirkung gibt die nachstehende Tabelle eine gute Übersicht.

Portion Nr.	10'	1 ^h	3 ^h	15 ^h	24 ^h	36 ^h	48 ^h
1	+	+++	+++	++++			
2	++	+++	++++				
3	+++	++++					
4	-	++	+++	++++			
5	++	+++	++++				
6	+++	+++	++++				
7	-	-	-	-	(+)	+	++
8	-	-	(+)	-	+	++	+++
9	-	-	(+)	-	+	+++	++++
10	-	-	-	2x -	2x -	2x -	
11	-	-	-	2x -	2x -	2x -	
12	-	-	-	-	-	(+)	

Signaturerläuterung: - = keine Verfl. ++ = gute Verfl.
 (+) = anged. Verfl. +++ = sehr g. Verfl.
 + = deutl. Verf. ++++ = vollst. Verfl.
 2x - = Viskosität ist erhöht

Sämtliche Versuchsgläser waren während der Versuchsdauer gut verschlossen.

c) a. Versuchsergebnisse (Verflüssigungsversuch):

Die Versuchsergebnisse entsprechen völlig den in den Vorversuchen gewonnenen Resultaten. Es lässt sich somit sagen,

1. Kinetin übt eine sehr starke Verflüssigungswirkung auf das Exsudat aus. Diese ist nach 10 Minuten abgeschlossen, sofern eine ausreichende Konzentration verwendet wird (3). Ist die Konzentration geringer, steigt die Zeit bis zum Eintritt der vollen Wirkung an.
2. Luronase hat gegenüber Kinetin eine gering verzögerte Wirkung, bzw. bedarf es höherer Konzentrationen (6).
3. Der zu prüfende Wirkstoff D vermag nur nach einem längeren Zeitintervall (zumindest mehr als 24 Stunden) eine reelle Verflüssigungswirkung zu entfalten. Diese ist bei ausreichender Konzentration nach 48 Stunden gleichfalls vollständig eingetreten (9).
4. NaCl 0,9%ig übt nach einiger Zeit bei Verstärkung der Viskosität aus (10). Elektrolytveränderung!
5. Diese tritt auch ohne NaCl-Einwirkung bei längerem Stehen des Exsudates ein.

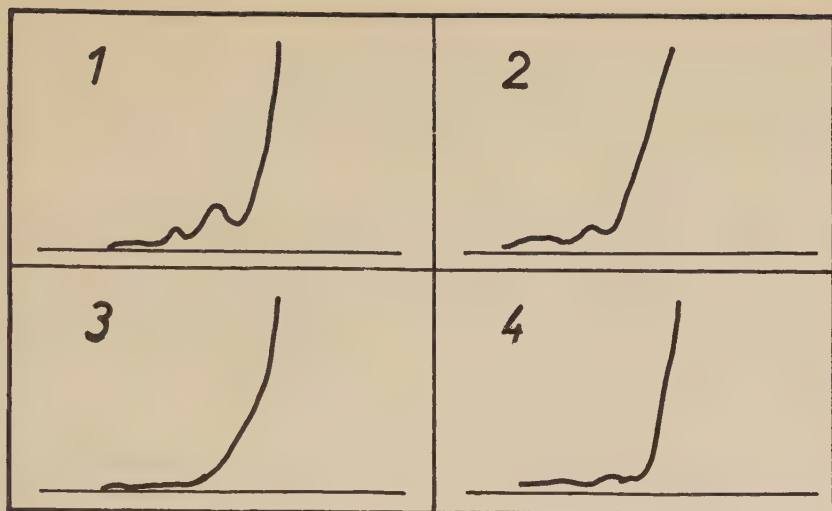
Worauf ist diese Verflüssigungs-Wirkung (=Reduzierung der Viskosität) der Hyaluronidase oder in der biologischen Wirkung hyaluronidaseähnlicher Stoffe zurückzuführen?

Wie Gibian (1) ausführt, zeichnet sich die Hyaluronidase dadurch aus, dass sie den Viskositätsgrad hyaluronsäurehaltiger Flüssigkeiten herabzusetzen vermag. Es handelt sich dabei um eine echte Ferment-Substrat-Wirkung unter gleichzeitiger Depolymerisation des Substrates. Es scheint der Schluss möglich, dass auch Wirkstoff D eine Depolymerisation - wenn auch erst nach langzeitiger Einwirkung - der Hyaluronsäuremoleküle herbeiführt.

Die Verstärkung der Viskosität nach Zugabe von NaCl entspricht den gemachten Erfahrungen der Viskositätserhöhung durch Veränderung der Elektrolytkonzentration.

b. Versuchsergebnisse (Elektrophorese):

Die Ergebnisse in Bezug auf die Elektrophorese mögen folgende schematisch wiedergegebenen Teile des Elektrophorese-Diagramms veranschaulichen.



1 = Reines Exsudat, 2 = Wirkstoff D 5 mg
 3 = 25 IE Kinetin, 4 = 200 VRE Luronase

Bezüglich der Auswirkungen im Elektrophoretogramm kann somit gesagt werden, dass Hyaluronidase insofern eine deutliche Ferment-Substrat-Wirkung ausübt, als die Hyaluronsäurezacke des Diagramms verkleinert oder völlig zum Verschwinden gebracht wird.

Wirkstoff D übt eine gleichsinnige, aber weniger starke und weniger schnell einsetzende Wirkung aus. Die Hyaluronsäurezacke wird nicht völlig abgebaut. Die Depolymerisation geht langsamer vor sich. Nach einer Stunde ist noch keine Veränderung, nach 36 Stunden eine weitgehende Verkleinerung der vor der Albuminfraction liegenden Hyaluronsäurezacke eingetreten. Die von Schürch und Mitarbeitern gewonnenen Ergebnisse finden in der vorliegenden Versuchsreihe ihre Bestätigung.

IV. 4. PRÜFUNG DES WIRKSTOFFES D MITTELS KANINCHEN-OHRKAMMER, DIREKTBEOBSACHTUNG DER AUSWIRKUNG AUF KAPILLARE UND INTERSTITIUM.

a) Kurzer Abriss der wissenschaftlichen Zusammenhänge.

Um die Frage der Abhängigkeit der Gefäß-, besonders Kapillarpermeabilität von der Hyaluronidasewirkung zu untersuchen, sei die Problematik dieser Fragestellung kurz erläutert.

Veranschaulicht man sich den Bau der Gefäße, besonders der Kapillaren, muß man zu dem Schluss gelangen, dass sie als Organe mesenchymalen Ursprungs einer starken Funktionsabhängigkeit der Ferment-Substrat-Wirkung der Hyaluronidase unterliegen. Nach FAWCETT (278) sind ihre hauptsächlichen Strukturelemente Endothel, glatte Muskulatur und Bindegewebe. RATSCHOW (15) spricht von Endothel, Grundhäutchen (Basalmembran) und Pericyten (Adventitialzellen oder Rouget'schen Zellen).

Die Endothelzellen sollen nach FAWCETT zum Teil dachziegelförmig angeordnet sein. Die Ausbildung der Gefäße wird nach BOENIGHOFF (279) wahrscheinlich durch bevorzugte Diffusionswege in der Grundsubstanz beeinflusst, wobei nach WHITES (280) als Stimulans für die Entstehung von Kapillaren das Fibroblastenwachstum wirkt. FAWCETT wies schon darauf hin, dass die Bindegewebszellen eine grosse Rolle für das Verhalten der Gefässwand spielen. Die Fibroblasten (oder Fibrozyten) bewirken nach dem gleichen Autor Entstehung und Erhaltung der Grundsubstanz, die Bildung und Formung des kollagenen und elastischen Faserskeletts. Diese geformten Bestandteile der Gefässwand sind in eine lichtmikroskopisch homogene Grundsubstanz gebettet. Dieser lichtoptisch leere Inhalt des interzellulären Raumes ist es, der nach LINDNER (281) im Mittelpunkt des Interesses steht. Eine ähnliche Meinung vertritt SCHALLOCK (283, 284). Wie vorher schon erwähnt, sind die Mastzellen, ihr Verhalten an und in der Gefässwand für die Frage der Grundsubstanz gleichfalls von grosser Wichtigkeit. In ihrem Cytoplasma ist Heparin oder dessen Vorläufer lokalisiert. Sie geben heparinartige Reaktionen, enthalten Mucoitinschwefelsäure und ihre Gesamtzahl nimmt mit zunehmenden Lebensalter ab. ASBOE-HANSEN (282) wies die Aufnahme von markiertem Schwefel in die Mastzellen nach und bringt dies mit der Produktion von Hyaluronsäure in Zusammenhang.

Zur Frage des Stoffaustausches in der Kapillare bestehen bisher leider noch stark widersprechende Meinungen. Nach RATSCHOW nehmen die Kapillaren hinsichtlich des Stoff- und Flüssigkeitsaustausches zwischen Blut und Gewebe eine Schlüsselstellung ein, da hier die Bauelemente der Gefässwand auf das geringst mögliche Mass reduziert sind. Die Kapillarwand stellt im allgemeinen keine starre semipermeable Membran dar, sie besitzt ein gewisses Auswahlvermögen und kann den Stofftransport aktiv regulieren. Nach STURM (285) erfolgt der

Stoffaustausch nicht durch die Kapillar-Endothelien hindurch, sondern durch die Spalten zwischen den Endothelzellen, da die Zellen nur durch Adhäsion, nicht aber durch eine besondere Kittsubstanz aneinanderhaften. Bei Reizung sollen dann feinste Spalten (meist submikroskopisch) freigegeben werden. Eine Kittsubstanz ist nach MOORE et al. (286) unwahrscheinlich. Nach CHAMBERS et al. (287) sowie ZWEIFACH (288, 289) wird jedoch eine Kittsubstanz angenommen. Gleichfalls tritt für das Vorhandensein einer Kittsubstanz KISCH (290) ein.

Eine weitere entscheidende Frage für den Stoffaustausch ist jene nach der Existenz von Stomata. Nach RATSCHOW sind sie bei nichtbeschädigten Kapillaren sicher nicht vorhanden, jedoch dann, wenn Ödeme vorhanden sind. ZWEIFACH ist der Meinung, dass eine Entstehung der Stomata nicht durch die Auflösung der interzellulären Kittsubstanz entstehen, weil nach MOORE (286) eine solche niemals nachgewiesen werden konnte. Nach CHAMBERS und ZWEIFACH ist die permeabilitätssteigernde Wirkung der Hyaluronidase nicht durch die Auflösung einer hypothetischen Kittsubstanz, sondern durch eine vermehrte Fragilität der Kapillarwand bedingt (288). GERSH und CATCHPOOLE (291) diskutieren die Dichtungsfunktion der Mucopolysaccharide dahingehend, dass die nach Einwirkung der Hyaluronidase erfolgte Depolymerisation der Mucopolysaccharide eine gesteigerte Durchlässigkeit der Kapillaren herbeiführt. Nachdem mit Sicherheit Mucopolysaccharide bisher nur in der Basalmembran nachgewiesen sind, würde diese Stellungnahme bedeuten, dass das Endothelrohr immer durchlässig ist, die Dichtungsfunktion allein durch die darüberliegende Basalmembran ausgeübt wird. CHARA (292) nimmt eine ähnliche Stellung ein. Die Änderung des Ca-Gehaltes als verantwortliches Geschehen für die Veränderung der Gefässpermeabilität wird gleichfalls vermutet. Nach HORT (293) ist lediglich die Änderung der Stoffwechselaktivität in der Zelle für die Entstehung eines Ödems verantwortlich. BARGMANN (294) vermutet eine Fehlsteuerung der morphologisch ständig Anpassungsvorgängen unterworfenen Kapillarwand.

Veranschaulicht man sich die zitierten Meinungen, so lässt sich sagen: Die Permeabilität der Kapillaren ist abhängig

1. von einer hypothetischen Kittsubstanz zwischen den Endothelzellen oder
2. von Einflüssen physikalischer Momente oder chemischer Substanzen, die auf die Adhäsionswirkung der Plasmagrenzflächen der Endothelzellen einwirken oder
3. von einer gesteigerten Stoffwechselleistung der Endothelzelle selbst, oder
4. von der Einwirkung chemischer Substanzen auf die Basalmembran. In Letzterer ist das Vorkommen von Hyaluronsäure sicher. Die Frage der Dichtungsfunktion der Mucopolysaccharide in der Basalmembran ist nicht geklärt, hypothetisch jedoch wahrscheinlich. Schliesslich
5. bleibt die Möglichkeit, dass zwei oder mehrere dieser Faktoren zusammenspielen.

Angeregt durch die Arbeit von SZABO und Mitarbeitern (295), die die Steigerung der Kapillarpermeabilität durch Hyaluronidase an Hand der Hämokonzentrationssteigerung ohne Plasmaproteinkonzentrationserhöhung, der Abnahme des arteriellen Blutdruckes und der Zunahme des relativen Lymphvolumen nachwiesen, wurde der Versuch unternommen, mittels direkter Kapillarbeobachtung das Phänomen der Permeabilitätssteigerung zu untersuchen.

Die Methode der Kaninchenohrkammer schien geeignet. Aus den Versuchen von SZABO ist bekannt, dass der Farbstoff Evans-Blau (= T 1824) eine innige Verbindung mit Albuminen eingeht. Gibt man daher den Farbstoff Evans-Blau in bestimmter Konzentration intravenös und eine gewisse Zeit später den zur Untersuchung bestimmten Wirkstoff gleichfalls intravenös, müsste man in vivo bei mikroskopischer Beobachtung der Kapillaren sowohl die Reaktion des Wirkstoffes auf das Gefäss als auch die gesteigerte Plasmaausströmung aus dem Gefäss in das Interstitium durch die dabei mit austretenden blau gefärbten Plasmaanteile beobachten können. In entsprechender Vergrösserung müsste es sogar möglich sein, die normalerweise oder durch den Wirkstoff vorhandenen Stomata mikroskopisch zu erkennen. Unter entsprechenden Voraussetzungen müsste die lokale Auswirkung des Wirkstoffes im Interstitium und an den Gefässen bei lokaler Applikation gleichfalls beobachtbar werden können.

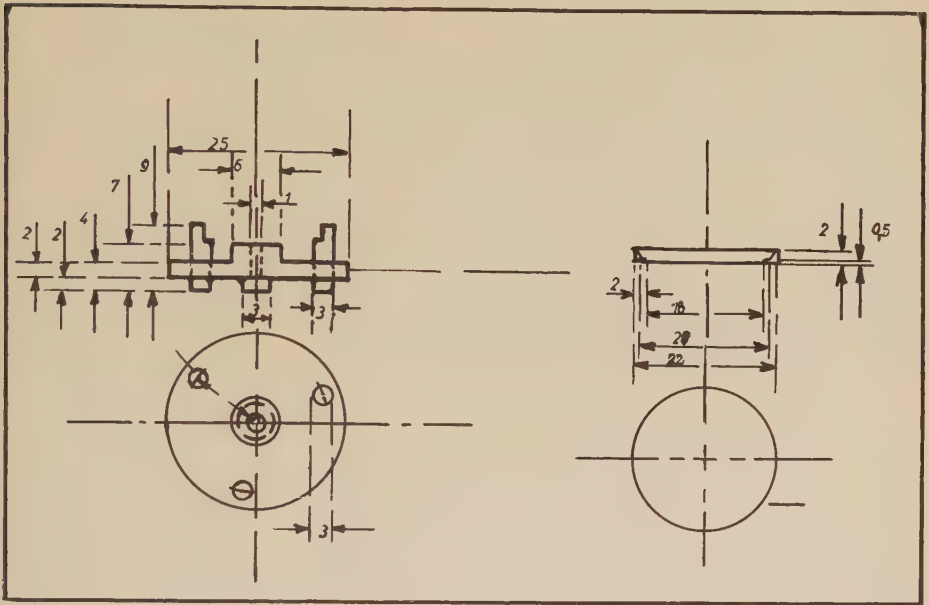
b) Methodik der Kaninchen-Ohrkammer.

Es erschien in Fortführung der bisherigen Untersuchungen ratsam, den physiologischen Effekt des zu untersuchenden Wirkstoffes mit Hilfe der Kapillar-Permeabilität in vivo zu prüfen. Die herkömmlichen bekannten Methoden der Direktbeobachtung von Gefässen in vivo an der Froschzunge, dem Ratten- oder Kaninchen-Mesenterium und ähnlichen schienen für diese Untersuchungen insofern nicht geeignet, da sie zum Teil nur unter Beifügung eines erheblichen operativen Traumas möglich sind. Ausserdem sind langzeitige Beobachtungen über mehrere Tage wegen der dabei entstehenden erheblichen patho-physiologischen Veränderungen des Beobachtungsfeldes nicht möglich. Bei der Suche nach einem geeigneten Verfahren stiess der Verfasser auf die Methode der Kaninchen-Ohrkammer. Es ist dabei nicht bekannt, ob über diese oder eine ähnliche Methode von anderer Seite schon publiziert wurde. Lediglich einige amerikanische pharmazeutische Firmen veröffentlichen mit diesen Ohrkammern gewonnene Ergebnisse.

Das Ziel der zu entwickelnden Methodik war die direkte mikroskopische Beobachtung der physiologischen Wirkung des Wirkstoffes an Kapillare und Interstitium. Gleichzeitig war die Möglichkeit einer langzeitigen Beobachtung gegeben. Zum weiteren musste sie mit den vorhandenen labormässigen Voraussetzungen in Einklang zu bringen sein.

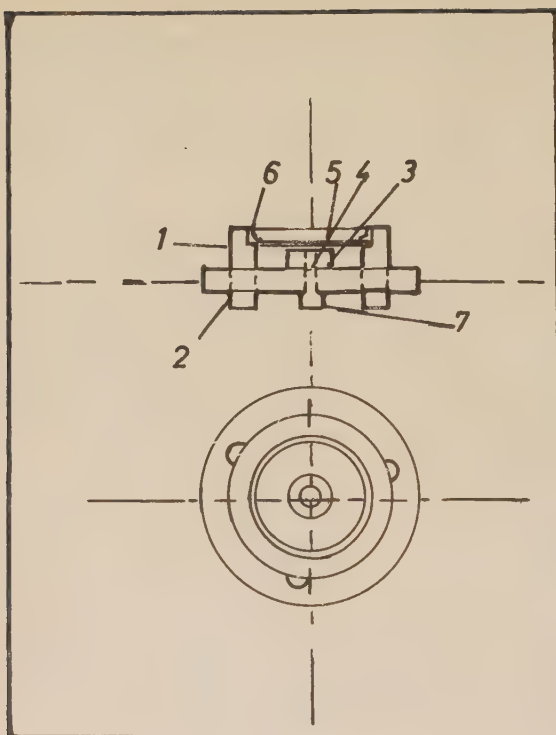
ba) Beschreibung der Kaninchen-Ohrkammer

Als Material zur Herstellung der Kammer dient ein Polyäthylen-Kunststoff.



Massgerechte Skizze der Kammer

1 = Kammerträger, 2 = Befestigungsring, 3 = Glimmerscheibe.



- 1 = Ringträger
- 2 = Kammerträger
- 3 = Lichtfenster
- 4 = Applikationskanal
- 5 = Glimmerscheibe
- 6 = Befestigungsring
- 7 = Verschlussbolzen des Applikationskanals

Beschreibung: Bei der Ohrkammer handelt es sich um eine runde Plexiglasscheibe von 25 mm Durchmesser. Die Bezeichnung **Kammerträger** wird empfohlen. Diese Scheibe ist peripher an drei Stellen, die gegeneinander um 120° versetzt sind, mit drei Bolzen versehen, die durch entsprechende Bohrungen durch den **Kammerträger** hindurchgeführt werden. Ihr Durchmesser beträgt 3 mm. In ihrem oberen Teil sind diese Bolzen mit einer halbkreisförmigen Nute versehen. Hierfür wird die Bezeichnung **Ringträger** als geeignet angesehen, da sie für die Aufnahme des Befestigungsringes bestimmt sind. Der mittlere Teil der Plexiglasscheibe ist in einem Durchmesser von 6 mm um 2 mm erhöht. Durch diese Erhöhung fällt das Licht der Mikroskopier-Leuchte. Die Bezeichnung **Lichtfenster** erscheint angebracht. Zentral ist der **Kammerträger** einschliesslich Erhöhung im Durchmesser von 1 mm durchbohrt. Diese Bohrung wird durch einen Bolzen verschlossen. Im Prinzip dient diese Öffnung der lokalen Applikation von gefässwirksamen Substanzen. Die Bezeichnungen **Applikationskanal** und **Verschlussbolzen** des Applikationskanals werden vorgeschlagen. In die Nuten der **Ringträger** wird eine **Glimmerscheibe** von 22 mm Durchmesser und 0,2 mm Stärke eingelegt. Diese wird durch einen straff in die **Ringträger** einge-

passten, an seinem inneren Rand um 45° abgeschrägten Plastikring gehalten. Die Bezeichnung Befestigungsring wäre hierfür entsprechend. Das verwendete Material besitzt den Vorteil, dass es, ohne beschädigt zu werden, mittels Alkohol weitgehend keimfrei gemacht werden kann.

bb) Methode der Implantation

Das Ohr eines ausgewachsenen Kaninchens von ca. 3,5 bis 4 kg wird auf seiner behaarten Seite im Umfang von etwa 6 cm sauber ausrasiert. (Abbildung 3). Ein elektrischer Rasierapparat hat sich dabei besser bewährt als ein Messer, Verletzungen der Lederhaut lassen sich dadurch vermeiden.

Es ist selbstverständlich, dass der gesamte Pflanzungsvorgang der Kammern als operativer Eingriff strenger aseptischer Kautelen bedarf. Nur so lässt sich eine komplikationslose Einheilung und einwandfreie Organisation des späteren Beobachtungsbereiches erreichen. Zusätzlich werden die operierten Kaninchen mit Antibiotika-Schutz versehen. Eine halbe Ampulle Centramyzin in 3-tägigem Abstand hat sich bewährt.

20 Minuten vor Operationsbeginn wird dem Kaninchen 0,1 g/kg Körpergewicht Evipan-Natrium zur Narkotisierung in die Muskulatur eines Hinterlaufes injiziert. Nach ca. 15 Minuten tritt bei nur selten auftretendem Exzitationsstadium die Vollnarkose ein. Narkosezwischenfälle haben wir nicht erlebt. In diesem Zustand werden dem Kaninchen mit 5 subcutanen Quaddeln 4 ml Novocain 2%ig zusätzlich in die Wurzel des Löffels appliziert. Zur eventuell notwendig werdenden Blutstillung halten wir mit Suparenin 1 : 1000 getränkte Tupfer bereit.

Unter weitestgehender Schonung aller Gefäße wird die Lederhaut auf einer kreisförmigen Fläche von ca. 35 mm abpräpariert. Nach Beherrschung der Technik konnten wir stärkere Blutungen bis auf wenige Ausnahmen nahezu völlig vermeiden. Nach Anzeichnung der Stanzpunkte wird mittels steriler Locheisen vom Durchmesser 3 mm für die Ringträger und 6 mm für das Lichtfenster mit kurzem, kräftigem Schlag der Ohrknorpel ausgestanzt. In die entstehenden Öffnungen wird die Ohrkammer von der Hinterseite des Löffels her eingeführt. Das gesamte Operationsgebiet wird mit steriler physiologischer Kochsalzlösung mehrmals gut abgespült. Anschliessend wird die Glimmerscheibe auf die genuteten Ringträger aufgelegt und der Befestigungsring eingedrückt. Ein Verschweissen der Ringträger mit dem Befestigungsring mittels glühender Injektionskanüle hat sich bewährt.

Da die Ohrknorpelstärke der Löffel verschieden ist, kommt es entscheidend darauf an, die Überstandshöhe der Ringträger über den Kammerträger so zu regulieren, dass zwischen Lichtfensteroberfläche und Glimmerscheibenunterseite eine nur sehr geringe Ergussdicke besteht. Dieser Zwischenraum ist mittels Hindurchschiebens der Ringträger durch den Kammerträger verhältnismässig leicht zu regulieren. Je dünner die Schichtdicke, desto länger steht die Kammer zur Beobachtung zur Verfügung und desto einwandfreier sind die Beobachtungsergebnisse. Nur bei geringer

Dicke der Organisationsschicht ist eine optimale Lichtausbeute möglich. Andererseits scheint es jedoch notwendig, darauf hinzuweisen, dass bei zu geringer Schichtdicke keine Organisation eintritt und wegen Ernährungsschwierigkeiten im Bereich der peripheren Knorpelbezirke mit einer Nekrose gerechnet werden muss. Anschliessend wird die Kammer mit sterilen Tupfern abgedeckt. Eine sterile Platte wird mit Leukoplast darüber befestigt. Über den gesamten Löffel wird eine feste Leinentüte gezogen, die mit Leukoplast an der Löffelwurzel befestigt wird. Hierzu siehe Abbildungen 1 - 9.

bc) Pflege und Versuchsvorbereitung der Kammer.

Wie bereits ausgeführt erhalten die Kaninchen in 3-tägigen Abständen eine halbe Ampulle Centramyzin. Der erste Verbandwechsel erfolgt nach acht Tagen. Die am Fell haftenden Leukoplastteile sind schonend (Benzin) zu entfernen, damit Entzündungen an der Löffelwurzel vermieden werden. Ist der umgebende Kammerbereich verschorft und lässt sich der Tupfer leicht abnehmen, wird die Wunde nach Prüfung des Organisationsgrades mit Penicillin-Puder gepflegt und wieder verbunden. Eine Ablösung des Tumpfers mit Gewalt nehmen wir nie vor, sondern warten auf die Selbstabstossung nach Verschorfung. Tritt diese bis zum ersten Versuch nicht ein, lässt sich notfalls der Tupfer über dem eigentlichen Kammerbereich leicht ausschneiden, so dass das mikroskopische Beobachtungsfeld über dem Lichtfenster leicht zugänglich wird. Die Kammer wird bei jedem Verbandwechsel, der, wenn zwischenzeitlich keine Mikroskopierung stattfindet, aller drei Tage erfolgt, gut gereinigt. Das Ohr wird gepudert, die Wurzel des Löffels am Innenohr zur Vermeidung von Räude mit Schwefelblüte gepflegt. Falls beim Mikroskopieren mit sehr starken Vergrösserungen Immersionsöl benutzt wird, ist die Kammer anschliessend besonders gut zu reinigen, da wir wiederholt eine milchige Trübung im Kammerbereich feststellen mussten, wenn dies nicht geschah. Dafür sind unter Umständen nicht völlig einwandfreie Glimmerscheiben verantwortlich. Ist die Kammer zur Beobachtung nicht mehr zu benutzen, sei es, dass die Organisation zu stark geworden ist oder Versuchsstoffe verwendet wurden, die länger als 10 Tage zur Eliminierung aus dem Organismus benötigen, wird sie entfernt. Dies macht in keinem Falle Schwierigkeiten. Der Befestigungsring wird mittels Pinzette vom Ringträger abgehoben, dann die Glimmerscheibe abgenommen und der Kammerträger nach hinten herausgezogen. Die entstehende Wunde schliesst sich innerhalb von zwei bis drei Tagen komplikationslos. Einer Pflege bedarf es nicht.

Funktionsschema:

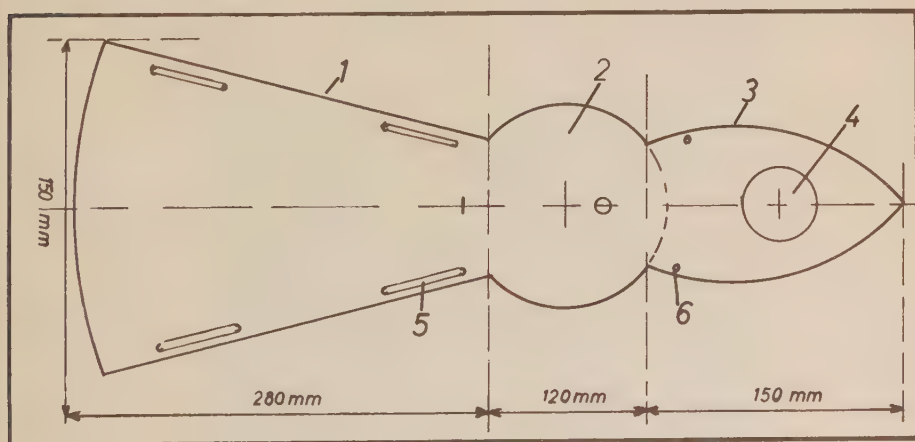
Zwischen Lichtfensteroberseite und Glimmerscheibe kommt es je nach Technik zu einem mehr oder weniger starken hämorrhagischen Erguss. Dieser Erguss wird normalerweise zwischen 10 und 14 Tagen von der Peripherie der Kammer her resorbiert. Gleichzeitig tritt eine Organisation im Kammerbereich ein. Es lässt sich im mikroskopischen Bild einwandfrei beobachten, wie die Gefässe im Bereich des Lichtfensters ausgebildet werden. Über den Bezirk des Lichtfensters ist eine mik-

roskopische Beobachtung bis zur Vergrößerung 1 : 1 200 im durchfallenden Licht einwandfrei durchführbar. Voraussetzung ist die gute Beherrschung des Einpflanzen. Erstens muss die Schicht, wie bereits ausgeführt, die entsprechende Stärke haben. Zweitens muss sie so gering hämorrhagisch wie möglich sein, um eine gute Lichtausbeute zu erzielen. Die Kammer bleibt 8 - 12 Tage beobachtungsfähig. Nach diesem Zeitraum muss sie entfernt werden, da die Organisation schnell an Dicke zunimmt und auch mit sehr guten Mikroskopen keine einwandfreie Beobachtung mehr möglich ist. Lediglich die direkt unter der Glimmerscheibe liegenden Gefäße sind dann noch erfassbar. Das Bild als solches ist verschwommen, da Überschneidungen der darunter liegenden Gefäße und Zellen die Grenzen verwischen und die Reduzierung des hindurchfallenden Lichtes keine optimalen Beobachtungsbedingungen mehr zulässt.

Im Mikroskopierfeld der beobachtungsreifen Kammer lässt sich die Wirkung pharmakologischer Substanzen auf Kapillaren und Interstitium einwandfrei in vivo beobachten. Die Versuchssubstanzen lassen sich intravenös, intramuskulär, subcutan oder direkt lokal an dem Beobachtungsort applizieren, ohne dass die Beobachtung unterbrochen werden muss.

Vorbereitung zur Mikroskopierung:

Das Versuchstier wird - wie unter bb) beschrieben - narkotisiert. Nach Eintritt der Vollnarkose wird es auf einem Aufschnallbrett befestigt.



Schematische Darstellung des Aufschnallbrettes
(nicht masstabgerecht)

Erläuterung zur Schemazeichnung:

- 1 = Lagerungsplatte für Kaninchenkörper
- 2 = Lagerungsplatte für Kaninchenkopf
- 3 = Lagerungsplatte für Kaninchenohr (drehbar)
- 4 = Öffnung für Ohrkammer
- 5 = Schlitz für Befestigungsriemen
- 6 = Bohrungen für Befestigungsbänder

Material: 2-mm-Aluminiumblech, schaumgummigepolstert

Das Beobachtungsbrett mit dem schlafenden Kaninchen wird so an das Mikroskop justiert, dass die Ohrkammer in der Mikroskopierebene liegt und sich leicht verschieben lässt.

Je nach Versuchsziel werden die verschiedenen Substanzen injiziert. Die Dokumentation der Versuchsergebnisse kann mittels Protokoll und, falls entsprechende Einrichtungen vorhanden sind, photographisch erfolgen.

Mit einmaliger Injektionsnarkose schläft das Kaninchen durchschnittlich zwei Stunden. Will man länger beobachten, kann man durch Nachinjektion von jeweils 0,1 g in 1 ml Evipan-Natrium den Beobachtungszeitraum bedenkenlos verlängern. Es wurden einzelne Kaninchen bis zu 6 Stunden komplikationslos bei diesem Schema unter dem Mikroskop gehalten.



Bild 1: Teile der Ohrkammer



Bild 2: Ohrkammer zusammengesetzt



Bild 3: Kantoctienohr ausgerastert



Bild 4: Lederhaut abpräpariert



Bild 5: Ohrknorpel ausgestanzt

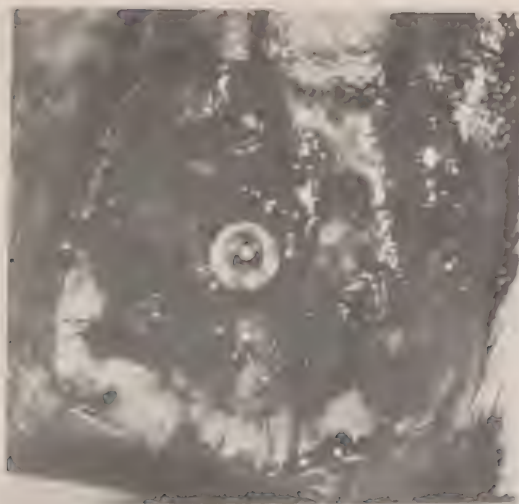


Bild 6: Kammerträger eingeführt



Bild 7: Kammer fertig montiert



Bild 8: Verband



Bild 9: Öhrtüte aufgesetzt



Bild 10: Aufschnallbrett z. Mikroskopieren

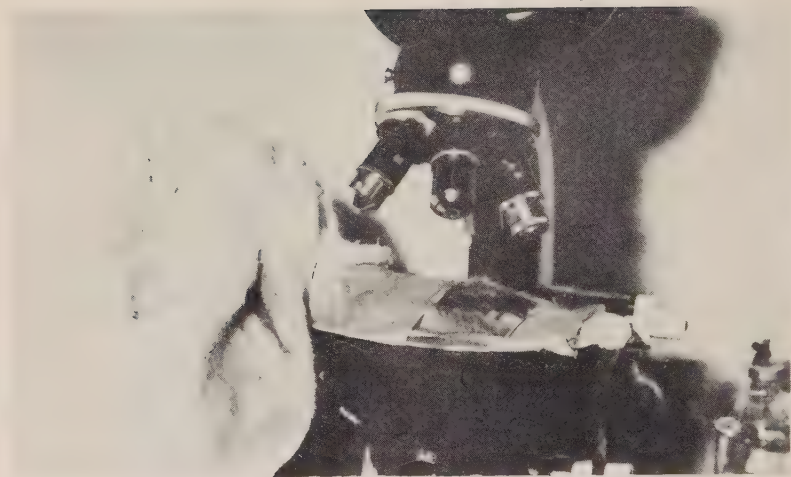


Bild 11: Kaninchen aufgeschnallt unter dem Mikroskop liegend

c) Einzelne Prüfungsverfahren und ihre Ergebnisse.

ca) Farbstoff i. v. und Wirkstoff i. v.

Im Evipan-Schlaf liegende Kaninchen erhalten die verschiedenen Wirkstoffe intravenös appliziert und eine Minute später 2 ccm Evans-Blau 1%ig. gleichfalls intravenös injiziert.

Versuchsergebnisse: (Mikroskopierungs-Protokoll)

1. Vor Beginn der Injektionen sind im Gesichtsfeld bei einer Vergrößerung von 1 : 120 die Gefäße scharf abgegrenzt, die Blutströmung ist nach Plasmasaum und Axialstrom deutlich differenziert. Die zwischen den Gefäßen liegenden korpuskulären Bestandteile befinden sich in völliger Ruhe. Das Gesichtsfeld bietet einen Ausschnitt der Ohrkammer, der ca. 1/8 des Kammerbereiches umfasst. Vor Injektionsbeginn wird bei einer Vergrößerung von 1 : 480 ein Kameraausschnitt gewählt, der die einwandfreie Beobachtung von zwei kleinsten Gefäßen erlaubt. Der Wandstruktur nach handelt es sich um Kapillaren. Diese Auffassung findet ihre Bestätigung in der Art des Blutstromes in diesen Gefäßen. Es vermögen die einzelnen korpuskulären Blutbestandteile nur hintereinander das Gefäßlumen zu passieren. Am Rand des Gesichtsfeldes befindet sich ein größeres Gefäß. Die Strömungsrichtung ist peripher auf den Resorptionswall in der Mitte der Kammer zu orientiert. Nach einwandfreier Justierung erfolgt die wie oben beschriebene Injektion. Nach:

- 2' : (nach Gabe von Wirkstoff D), es tritt eine deutliche Beschleunigung des Blutstromes ein. Das ist sowohl an der intensiveren Durchströmung der Kapillaren als auch des grösseren Gefässes (einzelne Zellgrenzen von Blutkörperchen sind hier nicht mehr erkenntlich) zu diagnostizieren. Der axiale Stromanteil mit Blutkörperchen füllt nunmehr das Gefäss bis zur Wand aus, ein Randsaum von Plasma ist nicht mehr vorhanden. Die zwischen den Gefässen liegenden Zellen geraten in heftige Bewegung. Auch jenseits des Resorptionswalles im unorganisierten Gebiet tritt eine intensive Zellbewegung auf. Vorher herrschte dort völlige Bewegungsruhe.
- 6' : Im Gesichtsfeld, nahe den Gefässwänden, ist eine deutliche Blauverfärbung zu erkennen, die sich rasch über den gesamten interstitiellen Raum ausbreitet. Die Verfärbung jenseits des Resorptionswalles ist intensiver als jene des organisierten Bereiches. Die starke Bewegung der korpuskulären Bestandteile und Zunahme des Flüssigkeitsvolumens ausserhalb der Gefässe (erkenntlich an einem freien Umherschwimmen von Zellen) hält an, nimmt an Stärke jedoch nicht mehr zu.
- 10' : Blauverfärbung hat an Intensität nur gering zugenommen. Bewegung unverändert.
- 15' : Ein geringer Plasmarandsaum beginnt sich wieder abzuzeichnen. Weiterhin geringe Zunahme der Blaufärbung. Die Bewegung hinter dem Resorptionswall wird deutlich erkennbar geringer.
- 20' : Die Situation ist unverändert.
- 25' : Der Plasmarandsaum hat sich verstärkt, die interstitielle Zellbewegung ist im Abklingen. Die Blauverfärbung im organisierten Bereich ist deutlich weniger stark als im unorganisierten Anteil. Die Gefässgrenzen sind - wahrscheinlich durch erhöhtes Flüssigkeitsvolumen zwischen Glimmerscheibe und Gewebe nicht scharf abzugrenzen. Das gesamte Beobachtungsfeld macht einen etwas verwaschenen Eindruck.
- 35' : Die Interstitielle Bewegungsintensität ist nahezu abgeklungen. Ein Plasmarandsaum im grösseren Gefäss wird deutlich sichtbar. Der kapilläre Blutstrom ist nicht mehr zusammenhängend, sondern bisweilen abgerissen. Die Strömungsgeschwindigkeit im grösseren Gefäss nimmt ab. Einzelne Zellgrenzen ab und zu zu differenzieren. Die Blauverfärbung im nicht organisierten Bereich bei völliger Ruhe intensiv, im organisierten Bereich blass.
- 40' : Die Zell- und Gefässgrenzen im Gesichtsfeld zeichnen sich wieder deutlich und klar differenzierbar ab. Die interstitielle Bewegung im organisierten Bereich nahezu 0.
- 45' : Man hat den Eindruck, dass, abgesehen von der Farbstoffeinlagerung, die Ausgangslage wieder hergestellt ist. Nur der Axialstrom im grösseren Gefäss hat seine normale Ausdehnung noch nicht wieder erreicht, er ist gering verbreitert. Gleichzeitig scheint es, dass sich an der Gefässwand des grösseren

Gefässes ein grösserer Anteil nichterythrozytärer Blutbestandteile ansammelt. Die roten Blutkörperchen in den Kapillaren treten an Menge zu Gunsten grösserer Blutkörperchen, die nicht rot gefärbt sind, zurück. Bei der Passage durch die Kapillaren kommt es dabei deutlich zu Wandausbuchtungen des Gefässes. Eine nähere Differenzierung ist bei der gegebenen Vergrösserung nicht möglich.

60' : Wenn man die Blauverfärbung vernachlässigt, ist das normale Bild wieder hergestellt. Der Verfärbungsgrad ist unverändert.

90' : unverändert.

120' : unverändert.

180' : normale Gefäss- und Strömungssituation. Blauverfärbung im nicht organisierten Gebiet weist gleiche Intensität auf. Im organisierten Bereich erscheint sie etwas schwächer.

240' : Beobachtung abgebrochen. Unveränderte Situation.

24^h : intensive Blauverfärbung im nicht organisierten Bereich. Geringe interstitielle Bewegung im gleichen Raum. Im gleichen Gefässgebiet, wie es der Erstbeobachtung entspricht, hat der Verfärbungsgrad abgenommen. Die gesamte Gewebsstruktur ist etwas unscharf. Die Zellen im Interstitium scheinen dichter zu liegen bzw. kontrastreicher zu wirken. Zum Teil überdecken sie das Gefäss.

Zusammenfassung: Nach Gabe von Wirkstoff D (5 mg) und 2 ccm Evans-Blau 1%ig intravenös kommt es nach 2' zu einer deutlichen Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit im Gefäss. Die interstitielle Bewegung nimmt an Intensität zu. Nach 6' ist die erste Farbstoffablagerung zu beobachten. Sie wird besonders deutlich im nicht organisierten Bereich. Die vorübergehend verwaschene Gewebsstruktur ist nach ca. 45' wieder aufgehoben. Die Verfärbung ist auch nach 24^h noch deutlich erkennbar.

2. (75 IE Kinetin und 2 ccm Evans-Blau intravenös).

Vergrösserung 1 : 1200. Es handelt sich um ein einwandfrei organisiertes Gesichtsfeld. Im Beobachtungsbereich liegt eine Kapillaraufzweigung. Die Gefässwände sind deutlich erkennbar. Das Kapillarlumen füllt das gesamte Gesichtsfeld nahezu aus. Ein kleiner Ausschnitt des Interstitiums wird mit beobachtet.

Nach:

1' 40'' : Die Strömungsgeschwindigkeit in der Kapillare steigt rapid an. Der Erythrozytenfaden reisst nicht mehr ab. An der Aufzweigung kommt es zu Stauungen mit Wandausbuchtungen und zu starker Bewegung in der Umgebung der Kapillargabel. Das Lumen des Stammgefässes sowie der Zweige ist deutlich erweitert. Verfärbung nicht erkenntlich.

5' : Es kommt zum Austritt von Zellen aus dem Gefäss in das Interstitium. Die Kapillarwand ist an der Austrittsstelle eindeutig unterbrochen. In der Wand, halb im Gefäss, halb im Interstitium, liegt eine grosse nicht rot gefärbte

Zelle. Der Kernstruktur nach zu urteilen ein Leukozyt. An anderer Stelle ist die Kapillarwand gleichfalls unterbrochen. Die vorüberströmenden Erythrozyten werden wie in einem Strudel an die Öffnungsstelle hingezogen, prallen auf das gegenüberliegende Gefässwandende auf und strudeln dann im Endothelrohr weiter. Der Austritt von roten Blutkörperchen konnte nicht beobachtet werden.

- 8' : Die roten Blutkörperchen schwimmen plangerecht im Endothelrohr. Die Unterbrechungen des Endothelschlauches sind nach wie vor deutlich erkennbar. Stomata? Es scheint, dass ein deutlicher Flüssigkeitsdruck aus dem Gefäss in den noch zu beobachtenden interstitiellen Anteil besteht. Es ist dieses Phänomen an einer schlierenartigen Lichtbrechung erkenntlich. Auch beginnt sich um die Stellen der fraglichen Wandunterbrechung eine Farbstoffablagerung deutlich abzuzeichnen. In den anderen mitbeobachteten interstitiellen Bereichen, wo keine Unterbrechung des Endothelschlauches bestand, ist diese Verfärbung an Intensität geringer.
- 10' : Es besteht keine Unterbrechnung des Endothelschlauches mehr. Das Strömungsbild beginnt sich zu normalisieren. Um einen Überblick zu gewinnen, wird auf die Vergrößerung 1 : 120 zurückgeschaltet.
- 12' : Normales Gefässbild. Im nicht organisierten Bereich deutliche Blaufärbung. Im organisierten Bereich schwächer. Insgesamt keine interstitielle Bewegung zu beobachten.
- 20' : Bild unverändert. Verfärbungsintensität im Vergleich zu Wirkstoff D stärker.
- 30' : unverändert. Beobachtung abgebrochen.
- 24^h : Gesamtverfärbungsintensität nahezu Null. Auch im nicht organisierten Bereich. Gefässgrenzen völlig klar zu differenzieren. Keine intersitiellen Bewegungen zu beobachten.

Zusammenfassung: Bei gleichzeitiger Gabe von Kinetin und Evans-Blau intravenös kommt es bereits nach 1'40'' zu einer deutlichen Erhöhung der Kapillar-Permeabilität, Verfärbung und intensiver Bewegung im Interstitium. Nach 10' tritt eine Normalisierung des Geschehens ein. Nach 20' ist nur noch eine Verfärbung im Intersitium und im Gefässsystem zu beobachten. Nach 24^h ist die normale Ausgangssituation wiederhergestellt.

3. Es werden 2 ccm Evans-Blau 1%ig ohne Wirkstoff intravenös injiziert. Vergrößerung 1 : 120. Die Ohrkammer ist zu ca. 30 % organisiert. Es besteht kein nennenswerter hämorrhagischer Erguss. Im Gesichtsfeld liegen mehrere grössere Gefässe, sowie einzelne Arteriolen und Kapillaren.

- 3' Es ist abgesehen von einer Blauverfärbung des Plasmarandsaumes in den grösseren Gefässen keine Veränderung wahrzunehmen. Lediglich die Strömungsgeschwindigkeit erscheint erhöht.

- 5' Unverändert
- 10' Unverändert
- 15' Unverändert
- 20' Unverändert
- 30' Die Strömungsgeschwindigkeit erscheint im Vergleich zur Ausgangsgeschwindigkeit verlangsamt. Eine geringgradige Verfärbung innerhalb der Gefäße im Gebiet des Plasmarandsaumes nach wie vor erkenntlich. Vereinzelt tritt auch im Interstitium geringe Blauverfärbung auf. Dieser Effekt ist nicht homogen, sondern nur sporadisch zu beobachten.
- 2^h Unveränderte, normale Situation.
- 3^h Unverändert
- 4^h Unverändert
- 5^h Unverändert
- 6^h Unverändert Beobachtung abgebrochen.
- 24^h Keine Blauverfärbung im Kammerbereich erkenntlich.

Zusammenfassung: Bei der intravenösen Gabe von Farbstoff ohne Zugabe von Wirkstoff kommt es zu keiner nennenswerten Gefäßveränderung. Sicher nicht zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Vereinzelt kommt es zum Austritt Farbstoff tragender Plasmaanteile in das Interstitium. In der Hauptsache bleibt der Farbstoff im Plasma der Gefäße lokalisiert.

Die Versuche 4 - 7 werden hier nur in der Zusammenfassung wiedergegeben.

- 4. Zusammenfassung: (75 IE Kinetin + 4 ccm Evans-Blau intravenös)
Ähnlich wie in Versuch 2 kommt es schon innerhalb der ersten 2 Minuten zu einer gesteigerten Kapillarpermeabilität, die an der Verfärbung und gesteigerten Zellbewegung im interstitiellen Raum erkenntlich wird. Die Strömungsgeschwindigkeit im Gefäß ist gesteigert. Der Plasmarandsaum nahezu aufgehoben. Nach 11 Minuten tritt eine Normalisierung des Geschehens ein. Die Verfärbung im interstitiellen Gebiet ist intensiver als in Versuch 2. Nach 24 Stunden ist sie völlig aufgehoben.
- 5. Zusammenfassung: (10 mg Wirkstoff D + 4 ccm Evans-Blau intravenös). Die Erhöhung der Kapillarpermeabilität tritt nach ca. 5 Minuten ein. Zum gleichen Zeitpunkt wird der erste Austritt Farbstoff tragender Plasmaanteile aus dem Gefäß beobachtet. Deutlich verwaschene Gefäßstruktur, die bis 65 Minuten anhält. Von diesem Zeitpunkt an beginnt sich das Bild wieder zu klären. Die Ruhe im Interstitium kehrt langsam zurück. Die Anordnung des strömenden Gefäßinhaltes normalisiert sich. Die Blauverfärbung in- und ausserhalb des Gefäßes ist intensiv. Nach 24 Stunden ist der Zustand unverändert. Nach 36 Stunden ebenfalls.

6. Zusammenfassung: (Leerversuch mit 4 ccm Evans-Blau intravenös). Es kommt zu keinerlei Veränderung der Permeabilitätsverhältnisse. Die Strömungsgeschwindigkeit bleibt konstant. Der Plasmaraum im Gefäß zeigt Blauverfärbung. Nach 5 Stunden vereinzelte Farbstoffaustritte aus dem Gefäß. Nach 24 Stunden sind diese unverändert nachweisbar.
7. Zusammenfassung: (2 mg Wirkstoff D + 2 ccm Evans-Blau intravenös). Die gesteigerte Permeabilität der Kapillaren tritt schwächer und erst nach 15 Minuten auf. Die interstitielle Bewegung und Verfärbung eindeutig geringer als bei den anderen Versuchen. Nach 50 Minuten ist die Wirkung abgeklungen. Normale Strömungsgeschwindigkeit, klares Beobachtungsbild.

Zusammenfassung der Versuchsergebnisse bei intravenöser Verabreichung beider Komponenten:

Wirkstoff D zeigt in Abhängigkeit von der Konzentration eine Steigerung der Kapillarpermeabilität, die sich durch Verfärbung des extravasalen Raumes, erhöhte Bewegung in diesem Raum und verwaschene Gefäßstruktur bei erhöhter Strömungsgeschwindigkeit und verkleinerten Plasmarandsaum dokumentiert. Wirkungseintritt und Dauer ist abhängig von der Konzentration. Kinetin zeigt gleiche Erscheinungen. Die Divergenz in der Wirkungsintensität gegenüber Wirkstoff D besteht in rascherem Wirkungseintritt, kürzerer Wirkungsdauer und stärkerer Verfärbung. Auch erscheint die Reaktion im Gefäß (Strömungsgeschwindigkeit, Plasmarandsaumveränderung) intensiver. Die Leerkontrollen ohne Wirkstoff erbrachten im Vergleich zu Kinetin und Wirkstoff D-Versuchen keine Veränderungen im Beobachtungsfeld, wenn man von der Verfärbung des intravasalen Plasmaraumes und vereinzelten Farbstoffaustritten aus dem Gefäß absieht.

Es mag naheliegen, die mittels der Ohrkammer-Methode gewonnenen Ergebnisse mit jenen zu vergleichen, die durch makroskopische Beobachtungen bestimmter Körperteile an Kaninchen bei gleicher Injektionsmethodik gewonnen wurden, (siehe Seite 44 ff.) Bei dieser Betrachtung ergibt sich wohl eine gleichsinnige Tendenz im Ablauf der Anflutung, Verfärbungsdauer und Abflutung des Farbstoffes. Die Maximalwerte sind jedoch zeitlich verschoben. Beim makroskopischen Versuch ergaben sich an Kaninchen für Kinetin Maximalwerte der Verfärbung nach 2 Stunden, für Wirkstoff D 4 - 5 Stunden. Im Ohrkammerversuch jedoch zeigte sich ein Maximalwert der Verfärbung bei Kinetin nach 20 Minuten und bei Wirkstoff D je nach Konzentration nach 60 - 100 Minuten.

Bei näherer Betrachtung zeigt sich jedoch, dass es nicht korrekt ist, diese beiden Untersuchungsmethoden überhaupt zu vergleichen. Um die Verfärbung an der Hautoberfläche zu erkennen, muss sie intensiv sein, zumindest intensiver als in der Ohrkammer. Sie wird an der Hautoberfläche durch verschiedene Umstände (Hautfarbe, Hyperämie, Haarwurzeln bei farbigem Fell etc.) überdeckt. Die Be-

obachtung in einer ca. 0,2 mm starken klaren und nahezu durchsichtigen, bzw. gering gelb verfärbten Gewebsschicht mit einzelnen Gefäßen durch das Mikroskop ist im Vergleich zur makroskopischen Überprüfung der Farbverhältnisse ungleich subtiler. Zusätzlich muss der Bereich einer organisierenden Kammer als ein Ort erhöhter Stoffwechselumsätze und damit bevorzugter Durchblutung angesehen werden. Die vorstehende Meinung findet eine Bestätigung der Tatsache, dass die makroskopische Beobachtung der im Ohrkammerversuch befindlichen Tiere keinesfalls - was die Verfärbungsintensität betrifft - mit der mikroskopischen Beobachtung zeitlich parallel liegt. Aus vorstehenden Gründen muss ein Vergleich der genannten Versuchsreihen unterbleiben.

cb) Farbstoff i. v. und Wirkstoff lokal im Beobachtungsfeld durch Applikationskanal.

Die Versuchsanordnung wie bei ca) im Evipan-Schlaf.

Nach i. v. Verabreichung von 4 ccm Evans-Blau 1%ig erhalten die Versuchstiere 0,05 ml des jeweiligen Wirkstoffes in der jeweiligen Konzentration per 1 ml lokal injiziert.

1. 5 mg Wirkstoff D. Vor Applikation besteht intensive Blauverfärbung des intravasalen Plasmaraumes.

30'' Schnelle Farbstoffanflutung und Verwischung der Gefässtruktur im Applikationsbereich.

1' Der extravasale Raum wird radiär von der Applikationsstelle nach peripher mit abfallender Intensität verfärbt. Interstitielle Zellbewegung, soweit die Verfärbung reicht.

3' Unverändert

5' Nur noch langsame Ausbreitung der Verfärbung

8' Die Ausbreitung ist zum Stillstand gekommen. Eine Gefässtruktur im Applikationsbereich noch nicht wieder erkennbar. Eine Veränderung der Strömungs- oder Permeabilitätsverhältnisse der ausserhalb des verfärbten Gebietes liegenden Gefäße kann nicht beobachtet werden.

10' Unverändert

15' Unverändert

20' Die heftige Zellbewegung im Zentrum des verfärbten Gebietes lässt nach. Zu einer Entfärbung des vorher verfärbten Bereiches kommt es nicht.

30' unverändert

40' Unverändert

60' Im Zentrum der Verfärbung beginnt sich eine Aufhellung abzuzeichnen. Dies ist auch strahlenförmig in einigen peripheren Anteilen der Fall.

70' Die Aufhellung verstärkt sich. In den aufgehellten Bezirken beginnt sich eine Gefässtruktur abzuzeichnen.

2ⁿ Nach nunmehr deutlich hervortretender Gefässtruktur, wobei eine Differen-

- zierung der Wandelemente wieder möglich ist, schreitet die Aufhellung rasch fort, jedoch nur dort, wo grössere Gefässe vorhanden sind.
- 3^h Der Farbstoff aus dem Gebiet der grossen Gefässe im extravasalen Raum völlig verschwunden. In den anderen Anteilen nach wie vor Verfärbung.
- 6^h Unverändert
- 24^h Die Farbstoffelimination aus dem extravasalen Raum im Gebiet der kleinen Gefässe, die auch jetzt noch nicht wieder zu differenzieren sind, unverändert. Im Gebiet der grösseren Gefässe strassenförmige Aufhellungsbezirke. Im verfärbten Bereich besteht ebenso wie über dem nicht mehr verfärbten Gebiet keine interstitielle Bewegung. Es hat den Anschein, dass die kleinen Gefässe nahe der Applikationsstelle irreparabel verändert wurden.
2. 75 IE Kinetin. Vor Applikation besteht intensive Blauverfärbung des intravasalen Plasmaraumes.
- 15'' Heftige Zellbewegung. Gefässtruktur milchig verschwommen. Beginnender Farbstoffaustritt.
- 45'' Der Plasmaaustritt aus dem Gefäss wird so intensiv, dass das Plasma durch den Applikationskanal nach aussen abläuft. Entlang der Gefässe peripher vom Applikationskanal bilden sich blaue Verfärbungsstrassen. Die Verfärbungsin-
tensität wird nach radiär schwächer.
- 1'30'' Es kommt auch zu einer mässigen Beschleunigung der Strömungsgeschwindigkeit. Eine deutliche Verbreiterung des Axialstromes im Gefäss kann nicht beobachtet werden. Zentral ist keine Gefässtruktur mehr erkennbar. Es besteht ausgesprochene Blauverfärbung mit heftiger interstitieller Bewegung.
- 3' Zentrale Aufhellung erkennbar. Peripher jedoch keine Veränderung der blauen Verfärbungsstrassen entlang der grösseren Gefässe.
- 5' Die Aufhellung hat zugenommen. Auch zentral vereinzelte Gefässtrukturen erkennbar. Keine weitere Ausbreitung der Verfärbung peripher. Nahezu völlige Ruhe im extravasalen Raum.
- 20' Unverändert
- 40' Unverändert
- 1^h Unverändert (Versuch unterbrochen)
- 24^h Keine Verfärbung mehr erkennbar. Normale Verhältnisse. Gefässtruktur noch nicht wieder eindeutig.

Zusammenfassung: Auch in dieser Versuchsanordnung ist das gleiche Ergebnis festzustellen wie in den bisherigen Untersuchungen, mit der Abweichung jedoch, dass im Applikationsgebiet des mit Wirkstoff D versehenen Gebietes keine Wiederherstellung des Ausgangszustandes eintrat, sondern der zentrale Kammerbereich nekrotisch wurde. Es scheint, dass die örtliche Konzentration der verabreichten Wirkstoffmenge in dem wenig organisierten und nur sehr dünnen Gewebsgebiet eine ausgesprochen toxische Wirkung entfaltet hat, weil ein schneller Abtransport nicht stattfinden konnte.

Die Überprüfung der gewonnenen Ergebnisse in 6 weiteren Versuchen zeigte, dass diese Vermutung richtig war. Bei einer Wirkstoff D-Konzentration von 1 mg/ml trat keine Nekrose ein. Bei einer Konzentration von 10 mg war die Nekrose umfangreicher als jene bei 5 mg. Die Kinetinkonzentration wurde nicht variiert. Die Parallelversuche mit Kinetin zeigten eine nahezu 100%ige Übereinstimmung mit den Ergebnissen unter 2.)

cc) Farbstoff lokal im Beobachtungsfeld, Wirkstoff i. v.

Bei dieser Versuchsanordnung wurden dem jeweiligen Versuchstier 0,1 ml Evans-Blau 1%ig lokal appliziert. Der Wirkstoff wurde in verschiedenen Konzentrationen durch die Löffelvene intravenös in jeweils 1 ml aqua dest. gelöst injiziert. Die Wirkung der intravenösen Wirkstoffgabe ist von den bisherigen Versuchen her bekannt. Auf eine Beschreibung wird, da sie völlig parallel läuft, verzichtet. Das Hauptaugenmerk der Beobachtung wird auf die lokale Farbstoffresorption gerichtet. Dem Versuch liegt die Überlegung zu Grunde, dass bei einer erhöhten Kapillarpermeabilität eine gesteigerte Plasmaausschüttung aus der Kapillare in den extravasalen Raum eintritt und der im extravasalen Raum eintritt und der im extravasalen Raum liegende Farbstoff eine raschere Eliminierung über das Lymphkapillarsystem erreicht. In einigen kleinen Gebieten, die grösseren Gefässen wandnah liegen, wäre sogar an einen Abtransport durch das Gefässsystem zu denken, wenn man die unter ca), 2, gemachte Beobachtung zu Grunde legt. Bei diesem Versuch kam es, wie ausgeführt, zu einer direkt beobachtbaren Wandunterbrechung der Kapillare. Im Bereich dieser fraglichen Stomata war im extravasalen Raum eine Wirbelbildung zu beobachten.

Der Protokollierung unterliegt der Zeitpunkt, nach dem die erste Aufhellung im Gebiet des lokal applizierten Farbstoffes erkannt werden kann.

1. 75 IE Kinetin i. v. Die erste Aufhellung wird im peripheren Gebiet nach 6' beobachtet. Bei einer Konzentration von
2. 150 IE Kinetin i. v. tritt die erste deutlich sichtbare Aufhellung im blauverfärbten Bereich entlang der grösseren Gefässe von peripher her nach zentral auf den Applikationskanal hin nach ca. 5' auf.
3. 2 mg Wirkstoff D i. v.. Die ersten Aufhellungszeichen finden sich nach 12'. Sie sind nicht deutlich an die grösseren Gefässe gebunden. Bei einer Konzentration von
4. 5 mg Wirkstoff D i. v. ist eine Aufhellung bereits nach 10' sichtbar.
5. 10 mg Wirkstoff D bewirken einen deutlichen Aufhellungseffekt nach 7'.
6. Eine lokale Applikation von Evans-Blau ohne Wirkstoffgaben zeigte nach 4^h noch keine periphere Aufhellung. Nach 24^h schien - es ist das bei der subjektiven Beobachtung nicht sicher auszusagen - der gesamte farbstoffimbibierte Bezirk gering aufgehellt. Der Gesamtumfang war jedoch nicht signifikant verkleinert.

Zusammenfassung: Die Versuchsreihe mit lokal appliziertem Farbstoff bei intra-venöser Wirkstoffgabe bestätigt die bisherigen Beobachtungen. Die Auswirkungen sind wiederum im Sinne einer Gefäßpermeabilitätserhöhung zu deuten. Stärke und Zeitpunkt dieses Effektes zeigten einen deutlichen Zusammenhang mit der Konzentration der verabreichten Wirkstoffe.

cd) Farbstoff und Prüfsubstanz im Beobachtungsfeld lokal appliziert. Diese Versuchsreihe wurde lediglich der Vollständigkeit halber durchgeführt. Die Versuchsergebnisse waren in keinem Fall so eindeutig, dass sie eine gültige Aussage in irgendeiner Form gestatten. Der Farbstoff im Zentrum war so intensiv, dass er die Auswirkungen des an gleicher Stelle applizierten Wirkstoffes völlig überdeckte. Auch waren die zur Applikation zur Verfügung stehenden Gewebsanteile so klein, dass mit dem verfügbaren Instrumentarium ohne Druckschädigung des Gewebes keine gleichen Mengen, und nur solche hätten eine gültige Aussage erlaubt, bei allen Tieren injiziert werden konnten. Eine Verfeinerung der Injektionsmethode bei diesem System, indem man sie zu einer Mikromethode ausbaut, liesse vielleicht gültige Aussagen zu. Aus vorstehenden Gründen wird von einer Bewertung dieser Versuchsergebnisse abgesehen.

d) Interpretation der Versuchsergebnisse

Mit der ausführlich beschriebenen Methodik der Kaninchen-Ohrkammer wird die Auswirkung des Wirkstoffes D an Hand der Ver- oder Entfärbung des mikroskopischen Beobachtungsfeldes mittels Evans-Blau-Lösung überprüft. Zum Vergleich werden Leerkontrollen durchgeführt. Zum Weiteren werden andere Tiere den gleichen Versuchsbedingungen mit Wirkstoff Kinetin unterworfen. Die Konzentration wird variiert.

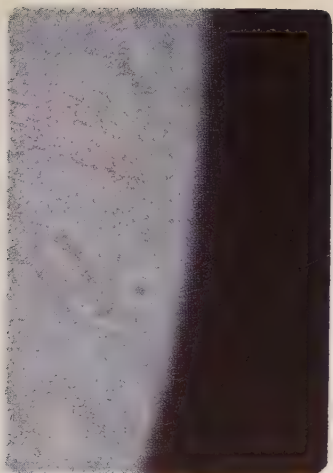
Es zeigt sich, dass Wirkstoff D mit steigender Konzentration eine deutliche Steigerung der Kapillarpermeabilität verursacht. Dies lässt sich an der verschiedenen Verfärbungsintensität, dem Zeitintervall bis diese eintritt und der Dauer der Verfärbung erkennen. Als Nebenwirkung treten eine Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit und eine Verkleinerung des intravasalen Plasmaraumes bei konstantem Gefäßlumen ein. Kinetin zeigt in Bestätigung der bisherigen Versuchsergebnisse eine stärkere Wirkung als Wirkstoff D. In zwei Fällen konnte eine Bildung von Stomata an der Kapillarwand beobachtet werden. Bei lokaler Gabe von Wirkstoff D kam es im Applikationsbereich zu Gewebnekrosen.

Durch die Versuchsreihe an der Kaninchen-Ohrkammer konnten die bisherigen Versuchsergebnisse in jeder Form bestätigt werden.

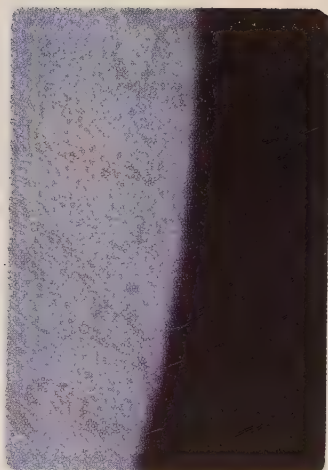
Zur Erläuterung der vorstehenden Versuche sind die auf den Seiten 85 - 87 angefügten farbigen Mikrophotographien bestimmt. Die mangelnde Qualität ist einmal in nicht ausreichendem photographischen Gerät zu suchen. Es fehlte vor allem an der zum Mikrophotographieren beweglicher Objekte notwendigen Elek-

tronen-Blitzeinrichtung. Zum anderen bedarf es einer gewissen Übung und Erfahrung, um gute und einwandfreie Mikrobilder herzustellen. An beidem mangelte es dem Verfasser, trotz langwährender Bemühungen.

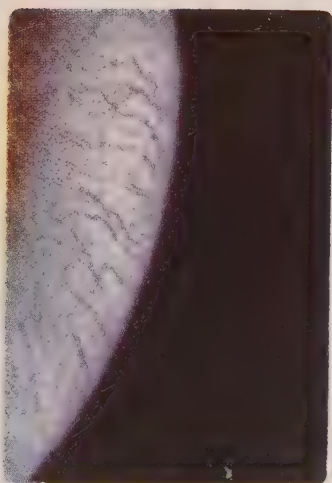
Abschliessend sei bemerkt, dass nach WILHELMI, zitiert nach DOMENJOZ (296), die Evipan-Natrium-Narkose bis zu einer Konzentration von 30 mg auf 100 g Tier keinen Einfluss auf die Wirkung der Hyaluronidase hat.



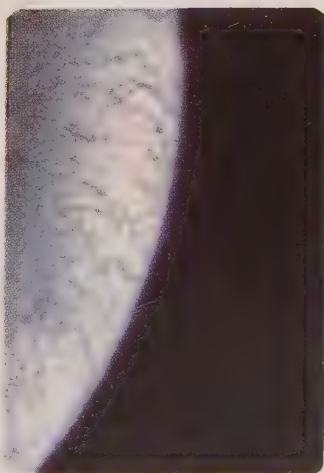
Dia 1



Dia 2



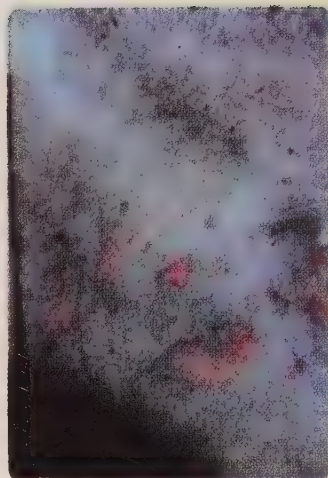
Dia 3



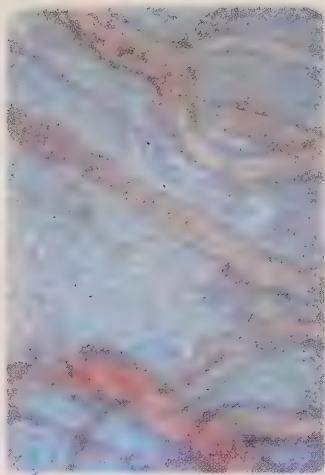
Dia 4



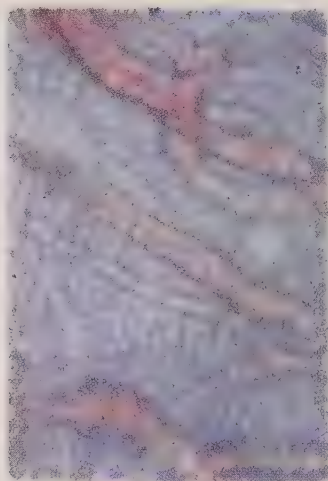
Dia 5



Dia 6



Dia 7



Dia 8



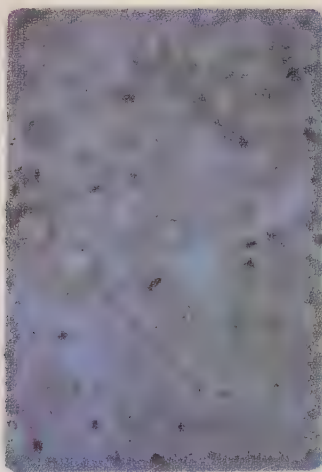
Dia 9



Dia 10



Dia 11



Dia 12

Erläuterungen zu den Dias auf den Seiten 85, 86 und 87:

- Dia 1: Kammerausschnitt mit Blauverfärbung 15 Min. p. I. von 4 ccm Evans-Blau und 5 mg Wirkstoff D i. v.
Abbildungsmaßstab: 85 : 1
Belichtungszeit: 1/ 30 sec.
Beleuchtung: Elektronenblitz 300 Ws
- Dia 2: dto. 20 Min. p. I.
- Dia 3: Kammerausschnitt in Entfärbungsphase. Blauverfärbtes Gewebe 15 Min. p. I. von 5 mg Wirkstoff i. v.
Abbildungsmaßstab: 30 : 1
Belichtungszeit: 1/ 50 sec.
Beleuchtung: Elektronenblitz 300 Ws
- Dia 4: dto. 50 Min. p. I.
- Dia 5: dto. 75 Min. p. I.
- Dia 6: Nicht organisierter Kammerbereich mit teilweiser Ergussbildung 20 Stunden p. I. von 4 von 4 ccm Evans-Blau und 5 mg Wirkstoff D i. v.
Abbildungsmaßstab: 100 : 1
Belichtungszeit: 1/ 50 sec.
Beleuchtung: Elektronenblitz 300 Ws
- Dia 7: Kapillaren und Arteriolen, sowie vereinzelte Arterienabschnitte im organisierten Kammerbereich während der Entfärbung. 10 Min. p. I. von 5 mg Wirkstoff D.
Abbildungsmaßstab: 250 : 1
Belichtungszeit: 1/ 100 sec.
Beleuchtung: Elektronenblitz 300 Ws
- Dia 8: dto. 40 Min. p. I.
- Dia 9: Kammerausschnitt mit einsprossenden Gefäßen und Resorptionswall am 5. Tag nach Kammerimplantation. 4 Stunden nach i. v. Injektion von 4 ccm Evans-Blau ohne Wirkstoff.
Abbildungsmaßstab: 15 : 1
Belichtungszeit: 1/ 30 sec.
Beleuchtung: Elektronenblitz 300 Ws
- Dia 10: dto. 20 Min. nach i. v. Injektion von 4 ccm Evans-Blau und 5 mg Wirkstoff D.

Dia 11: Kammerausschnitt während der Entfärbung (Gewebe 24 Stunden blau).
 50 Min. nach 5 mg Wirkstoff D i. v.
 Abbildungsmaßstab: 200 : 1
 Belichtungszeit: 1/ 50 sec.
 Beleuchtung: Elektronenblitz 300 Ws

Dia 12: Zellen im nekrotisierten Erguss nach Blaufärbung.
 Abbildungsmaßstab: 300 : 1
 Belichtungszeit: 1/100 sec.
 Beleuchtung: Elektronenblitz 300 Ws

Die Abbildungen 1 - 6 wurden mit dem Zeiss-Aufbaumikroskop hergestellt.^{+) Die Diapositive 1 - 12 wurden mit dem Leitz-Ortolux-Mikroskop mit Elektronenblitz-ausrüstung gefertigt. Als Film-Material wurde Kodachrom-Kunstlichtfilm benutzt. Die Entwicklung und Kopierung - soweit es sich um Abbildungen handelt, erfolgten im Werk Kodak in Stuttgart-Wangen.}

^{+) Abb. 1 - 6 wurden aus drucktechnischen Gründen aus der Originalarbeit in die gedruckten Exemplare nicht übertragen.}

IV. 5. VERSCHIEDENE PRÜFUNGSMETHODEN UND IHRE ERGEBNISSE

a) Beseitigung von Infiltraten:

In einigen wenigen Fällen, in denen der Einsatz von Hyaluronidase gemäss den bisher in der Literatur niedergelegten Erfahrungen Erfolg versprach, wurde ausser Kinetin und Luronase auch Wirkstoff D verwendet.

In einem Falle wurde der Versuch unternommen, ein Ganglion im Bereich des rechten Daumens (ca. taubeneigross) mittels D zu beeinflussen, eventuell zu beseitigen.

Bei der Verabreichung von 5 mg Wirkstoff D lokal zeigte sich in jedem Falle eine deutliche Hyperämie und gesteigerte Ödematisierung. Das Ganglion fühlte sich härter an und wies auch eine geringfügige Grössenzunahme auf. Der Patient äusserte einen zunehmenden Spannungsschmerz und ein Hitzegefühl im Kopf. Nach Abklingen dieser Sofortwirkung, spätestens nach zwei Stunden, war das Ganglion zunächst kleiner als vor der Injektion und die Haut darüber faltig. Nach 24 Stunden war die alte Form, Grösse und Konsistenz wiederhergestellt. Die Injektionen erfolgten in zweitägigem Abstand. Ein Dauererfolg oder eine nachhaltige Verkleinerung konnten nicht erreicht werden.

Nach acht Injektionen wurde Hyaluronidase in Form von Kinetin mit jeweils 75 IE anstelle von Wirkstoff D injiziert. Die auftretenden Folgeerscheinungen waren die gleichen wie bei Wirkstoff D. Die Hyperämie war jedoch geringer. Über Hitzegefühl im Kopf wurde nicht geklagt. Ein Dauererfolg konnte auch mit Kinetin nicht erreicht werden.

In einigen Fällen wurden schon langfristig bestehende Injektionsinfiltrate in der Glutaealmuskulatur mit Wirkstoff D behandelt. Von vier Fällen konnte in zwei Fällen eine Besserung beobachtet werden. Die Infiltrate wurden weicher und kleiner, die subjektiven Beschwerden der Patienten geringer. Schädliche Nebenwirkungen konnten auch hier nicht festgestellt werden.

Anamnestisch waren die beiden therapieresistenten Fälle schon über längere Zeit bestehend wie diejenigen, die sich der Wirkstoff D-Behandlung zugänglich zeigten. An eine bindegewebige Umorganisation der resistenten Infiltrate muss gedacht werden.

b) Heilungs- und Organisationstendenz von Wunden

Im Rahmen der unter IV, 4 beschriebenen Ohrkammerversuche konnte beobachtet werden, dass die gesetzten Wunden bei Tieren die Hyaluronidase in Form von Kinetin oder Luronase intramuskulär bekamen, schneller abheilten als bei jenen Tieren, die keine Wirksubstanz erhielten. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch nach Verabreichung von Wirkstoff D. Auch organisierten sich die Ergüsse in den eingesetzten Ohrkammern rascher. ROSENBERG (105) und

KRAMER (106) beschreiben ähnliche Ergebnisse nach Verabreichung von Hyaluronidase im Bezug auf die Heilungstendenz von Wunden. Sie stehen damit in Übereinstimmung mit den von anderen Autoren und vor allem von BRUCK (107) gemachten Beobachtungen. Diesbezüglich angesetzte Vergleichsversuche an Kaninchen brachten Ergebnisse, die bezüglich des zu untersuchenden Wirkstoffes von Interesse sind.

Die Ohrkammern wurden bei drei Kaninchen zu gleicher Zeit implantiert. Kaninchen 1 erhielt täglich 1 ccm NaCl i. m. Kaninchen 2 erhielt täglich 25 IE Kinetin i. m. und Kaninchen 3 täglich 2 mg Wirkstoff D i. m.

Kaninchen 1: (NaCl 0,9%ig) zeigte nach 6 Tagen die erste geringe, nur vereinzelt auftretende Granulation und Organisation im Beobachtungsbereich. Flächenmässig umfasste diese nur ca. 8%, der Erguss war zu etwa 10% resorbiert. Nach 10 Tagen betrug die Organisation 15% und die Resorption 30%.

Kaninchen 2: (Kinetin) zeigte nach 6 Tagen einen zu etwa 80% resorbierten Erguss. Die Organisation in der Kammer betrug mehr als die Hälfte, ca. 55%. Nach 10 Tagen war der Erguss zu 100% resorbiert und der Kammerbereich zu 75% organisiert.

Kaninchen 3: (Wirkstoff D) wies nach 6 Tagen eine Ergussresorption von etwa 45% auf. Die Organisation betrug ca. 35%. Die Gefässschläuche in den noch nicht organisierten Gebieten waren gut erkenntlich vorgezeichnet. Nach 10 Tagen waren 75% des Ergusses resorbiert und 75% des Kammerbereiches organisiert.

Nachdem unabhängig von dieser Versuchsreihe während der laufenden Permeabilitätsversuche festgestellt wurde, dass Ohrkammern von Versuchstieren, die Wirkstoffe zu Versuchszwecken intramuskulär oder intravenös erhalten hatten, für die Beobachtung schneller unbrauchbar wurden, weil der Erguss zu stark organisiert war und keine optimalen Beobachtungsbedingungen mehr gegeben waren, dürfte es sich bei vorliegender Wirkung um eine echte Einwirkung der Hyaluronidase bzw. des Wirkstoffes D auf die Hyaluronsäure handeln.

Es scheint einleuchtend zu sein, dass eine Substanz, die einerseits die Gefässpermeabilität erhöht und andererseits die Diffusionsmöglichkeiten im Interstitium zu beeinflussen vermag, eine schnellere Resorption und Gefässprossung bewirkt. Bei der Organisation der Kaninchenohrkammer, die von der Peripherie der Kammer her, also vom unbeschädigten Gewebe ausgehend erfolgt, ist der im Interstitium herrschende Flüssigkeitsdruck ein massgeblicher Faktor für die Ergussresorption und die Ausbildung von Gefässschläuchen.

Wie in allen anderen Versuchen beobachtet, hat auch hier die biologische Hyaluronidase in Form von Kinetin im Vergleich zum synthetischen Produkt des Wirkstoffes D eine kontrahiertere Wirkung. Über die Wirkungsdauer vermag auf Grund vorliegenden Versuches nichts ausgesagt zu werden.

Bei den durchgeführten Versuchen bessere Verträglichkeit bestimmter parenteral verabreichter Medikamente, Resorption älterer Injektions-Filtrate, schnellere Resorption von Ergüssen und Umorganisation bzw. Gefäßprossung in Ergussbezirken zeigte Wirkstoff D eine positive Wirkung. Diese war weniger stark als die von Kinetin. Subjektiv und objektiv konnte sie einwandfrei manifestiert werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG UND VERGLEICHENDE INTERPRETATION:

In verschiedenen Versuchen ist die hyaluronidaseähnliche Wirkung eines synthetisch hergestellten Wirkstoffes unbekannter Zusammensetzung zu prüfen. Der Fragestellung gemäss handelt es sich um Vergleichsversuche mit Präparaten, deren Hyaluronidasewirkung gesichert ist. Verwendet werden Kinetin, Luronase und der zu untersuchende Wirkstoff D in etwa äquivalenten Konzentrationen, die in Vorversuchen mit Hilfe der Wirkung als "spreading-factor" ermittelt wurden.

Als Erstes wird die Hyaluronidase-Hyaluronsäurewirkung mittels Steigerung der Erythrozytenpermeabilität an Hand der Aufnahme radioaktiver Substanzen geprüft. Die verwendeten Wirkstoffe zeigen sich alle gleich unwirksam. Eine Steigerung der Permeabilität bei den Versuchsgruppen mit Wirkstoffen ist bei einer Temperatur von 37° C nicht festzustellen. Damit ist gleichzeitig erwiesen, dass die verwendeten Hyaluronidase-Präparate und der zu untersuchende Wirkstoff in nicht toxischer Konzentration keine Schädigung der Erythrozytenmembran oder deren Funktionen herbeiführen.

Untersuchungen über die Steigerung der Kapillarpermeabilität am Tier, wenn Wirkstoff und Farbstoff intravenös gegeben werden, zeigen eine signifikante Permeabilitätserhöhung. Die Wirkungsintensität differiert von maximal nach minimal in der Reihenfolge Kinetin, Luronase, Wirkstoff D. Was die Wirkungsdauer anbelangt, ist die Reihenfolge Wirkstoff D, Luronase, Kinetin. Bei allen Versuchen weist Wirkstoff D einen eindeutigen und reellen Effekt auf.

Im Verflüssigungsversuch besitzen alle drei Substanzen in Bezug auf die Verminderung der Viskosität eine gleichstarke Wirkung. Das Zeitintervall bis zum Eintritt der Wirkung ist bei Kinetin am kürzesten und bei Wirkstoff D am längsten (30 Minuten und 24 Stunden). Alle drei Wirkstoffgruppen erzielen eine Reduktion des Viskositätsgrades bis zur totalen Verflüssigung bei wässriger Konsistenz.

Im Elektrophorese-Diagramm vermögen Kinetin und Luronase die vor der Albuminzacke einherlaufende Hyaluronsäurezacke schon nach kurzer Einwirkungszeit aufzuheben. Wirkstoff D erzielt den gleichen Effekt erst nach einer Einwirkungszeit von 36 Stunden. Im Leerversuch tritt keine Veränderung des Diagrammes ein.

Im Prüfungsverfahren mittels Kaninchen-Ohrkammer - dessen Methodik ausführlich beschrieben wird - ist eine Gefässwirksamkeit aller drei Substanzen schon nach relativ kurzer Zeit erkenntlich. Die Kapillar-Permeabilität wird in jedem Falle eindeutig erhöht. Kinetin zeigt auch hier eine sehr schnell einsetzende und starke Wirkung; diese hält jedoch weniger lang an. Wirkstoff D lässt eine spätere Wirkung bei längerer Wirkungsdauer und einer gegenüber Kinetin verminderten Wirkungsintensität erkennen.

Die Resorptions- und Organisationstendenz von Wunden liess sich durch Kinetin und Wirkstoff D im Sinne einer Beschleunigung dieser Vorgänge nachhaltig beeinflussen. Kinetin zeigte eine kontrahiertere Wirkung. Der Effekt von Wirkstoff D ist sehr eindrucksvoll.

Nach chemischen Gesichtspunkten handelt es sich bei der Hyaluronidase-Hyaluronsäurewirkung um eine echte Ferment- Substrat - Wirkung, die durch Depolymerisation des Substrates zustandekommt. Dieser Vorgang ist in vivo reversibel. Voraussetzung für die Wiederherstellung des Substrates ist das Vorhandensein ausreichender Energiequellen. Die Polymerisation der entstandenen Bruchstücke wird durch die Hyaluronsäure produzierenden Zellen vollzogen.

Bei der vom Wirkstoff D entfalteten Wirkung dürfte es sich - dem Zeitintervall bis zum Eintritt des Effektes und der Wirkungsdauer nach zu urteilen - um eine tiefer eingreifende Veränderung handeln. Ob es sich um eine reversible Depolymerisation oder tiefere Eingriffe in das chemische Gefüge der Hyaluronsäure handelt, ist noch zu diskutieren. Inwieweit bei entsprechender Konzentration diese Veränderung reversibler Natur bleiben, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abgeklärt werden. Bei geringeren Konzentrationen, wie sie in den vorliegenden Versuchen angewendet wurden, muss auf Grund der Ergebnisse in den Tierversuchen angenommen werden, dass ein reversibler, zumindest aber reparabler Vorgang vorliegt.

Abschliessend lässt sich als Gesamturteil über den Wirkstoff D im Sinne der Fragestellung auf Grund der vorliegenden Vergleichsversuche sagen:

- Wirkstoff D besitzt
1. eine deutliche Wirkung als "spreading-factor,
 2. die Zell-Permeabilität ist - soweit es sich auf die Erythrozytenmembran bezieht - nicht beeinflussbar.
 3. Die Kapillar-Permeabilität kann durch Wirkstoff D signifikant gesteigert werden.
 4. Bei Konzentrationen bis 5 mg/kg Tiergewicht trat keine kumulative Wirkung ein.
 5. Toxische Reaktionen wurden bei den unter 4.) angegebenen Konzentrationen nicht beobachtet.

LITERATURVERZEICHNIS

Die Vielzahl der verwendeten bibliographischen Abkürzungen macht es notwendig, dem Literaturverzeichnis eine Zusammenstellung der unbekannten bibliographischen Abkürzungen voranzustellen.

Acta allerg., Kbh.	ACTA ALLERGOLICA (KØBENHAVN)
Acta biol. belg.	ACTA BIOLOGICA BELGICA
Acta chir. jugosl.	ACTA CHIRURGICA IUGOSLAVICA (BEOGRAD)
Acta med. Scand.	ACTA MEDICA SCANDINAVIA (STOCKHOLM)
Acta otorhinolar. belg.	ACTA OTO-RHINO-LARYNGOLOGICA BELGICA (BRUXELLES)
Acta otorinolar. iber. amer.	ACTA OTO-RINO-LARINGOLÓGICA IBERO- AMERICANA (BARCELONA)
Acta phys. Scand.	ACTA PHYSIOLOGICA SCANDINAVIA (STOCKHOLM)
Actas derm. síf. Madr.	ACTAS DERMO-SIFILOGRÁFICAS (MADRID)
Advances Enzymol.	ADVANCES IN ENZYMOLOGY AND RELATED SUBJECTS BIOCHEM. (N. Y.)
A. M. A.	AMERICAN-MEDICAL-ASSOCIATION
A. M. A. Arch. Derm.	A. M. A. ARCHIVES OF DERMATOLOGY (CHICAGO)
A. M. A. Arch. Int. M.	A. M. A. ARCHIVES OF INTERNAL MEDICINE (CHICAGO)
Am. J. Obst.	AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY (SAINT LOUIS)
Amer. J. Ophth.	AMERICAN JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY (CHICAGO)
Amer. J. Psychol.	AMERICAN JOURNAL OF PSYCHOLOGY (AUSTIN/TEXAS)
Am. J. Surg.	AMERICAN JOURNAL OF SURGERY (NEW YORK)
An. paul. med. cir.	ANAIS PAULISTAS DE MEDICINA E CIRURGIA (SAO PAULO)

An. otolar., Par.	ANNALES D'OTO-LARYNGOLOGIE (PARIS)
An. Phys. M., Lond.	ANNALS OF PHYSICAL MEDICINE (LONDON)
Antibiotic M.	ANTIBIOTIC MEDICINE (NEW YORK)
Arch. chir. neerl.	ARCHIVUM CHIRURGICUM NEERLANDICUM (ARNHEM)
Arch. col. med. Salvador	ARCHIVOS DEL COLEGIO MEDICO DE LE SALVADOR (SAN SALVADOR)
Arch. españ. urol.	ARCHIVOS ESPANOLAS DE UROLOGÍA (MADRID)
Arch. ital. chir.	ARCHIVO ITALIANO DE CHIRURGICA (BOLOGNA)
Arch. mal. prof., Par.	ARCHIVES DES MALADIES PROF. DE MÉD. DU TRAVAIL ET DE SÉCURITÉ, PARIS
Arq. brasil. med.	ARQUIVOS BRASILEIROS DE MEDICINA (RIO DE JANEIRO)
Arzneimittelf. (Aulendorf)	ARZNEIMITTELFORSCHUNG, AULENDORF (WÜRTT.)
Bacteriol. Rev.	BACTERIOLOGICAL REVIEW (BALTIMORE)
Biochem. J. London	BIOCHEMICAL JOURNAL (LONDON)
Bioch. Zsch.	BIOCHEM. ZEITSCHR. (BERLIN)
Biochim. biophysiol. acta	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (AMSTERDAM)
Biol. Zschr.	BIOLOGISCHE ZEITSCHRIFT (BERLIN)
Boll. ocul.	BOLLETINO D'OCULISTICA (BOLOGNA)
Brit. J. Exper. Path.	BRITISH JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY (LONDON)
Brit. M. J.	BRITISH MEDICAL JOURNAL (LONDON)
Bull. Soc. fr. derm. syph.	BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE DERMATOLOGIE ET DE SYPHILOGRAPHIE (PARIS)
Bull. Soc. fr. opht.	BULLETINS ET MÉMOIRES DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE D'OPHTALMOLOGIE (PARIS)
Bull. soc. opht. France	BULLETIN DES SOCIÉTÉS D'OPHTALMOLOGIE DE FRANCE (PARIS)

Bull. Soc. roy. Soc. Liège	BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ ROYAL DES SCIENCES (LIÈGES)
Cancer Res.	CANCER RESEARCH (CHICAGO)
Cesk. stomat.	CESKOSLOVENSKA STOMATOLOGIE (PRAHA)
Concours med.	CONCOURS MÉDICAL (PARIS)
C. rend. Soc. fr. gyn.	COMPTES RENDUS DE LA SOCIÉTÉS FRANÇAISES DE GYNÉCOLOGIE (PARIS)
Derm. Wschr.	DERMATOLOGISCHE WOCHENSCHRIFT (LEIPZIG)
Deut. med. Wschr.	DEUTSCHE MEDIZINISCHE WOCHENSCHRIFT (STUTTGART)
Deut. Stomat.	DEUTSCHE STOMATOLOGIE (BERLIN)
Dia méd., B. Air	DÍA MÉDICO (BUENOS AIRES)
Dis. Nerv. Syst.	DISEASES OF THE NERVOUS SYSTEM (GALVESTON)
Erg. Enzymforsch.	ERGEBNISSE DER ENZYMFORSCHUNG (LEIPZIG)
Farmaco, ed. prat., Paria	FARMACO, EDIZIONE PRACTICA (PARIA)
Gazz. med. ital.	GAZZETTA MEDICA ITALIANA (TORINO)
Gruźlica	GRUZLICA (WARSZAWA)
Helvet. med. acta	HELVETICA MEDICA ACTA (BASEL)
Hoppe-Seyler's Zschr.	HOPPE-SEYLER'SCHE ZEITSCHRIFT F. PHYSIOLOGISCHE CHEMIE (BERLIN)
J. Am. Dent. Ass.	JOURNAL OF THE AMERICAN DENTAL ASSOCIATION (CHICAGO)
J. Amer. Med. Ass.	JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION (CHICAGO)
J. Biol. Chem.	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (BALTIMORE)
J. Exp. Med.	JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE (BALTIMORE)
J. Internat. Coll Surgeons	JOURNAL OF THE INTERNATIONAL COLLEGE OF SURGEONS

J. Louisiana M. Soc.	JOURNAL OF THE LOUISIANA STATE MEDICAL SOCIETY (NEW ORLEANS)
J. M. Soc. N. Jersey	JOURNAL OF THE MEDICAL SOCIETY OF NEW JERSEY (ORANGE)
J. Ment. Sc., London	JOURNAL OF MENTAL SCIENCE
J. Michigan M. Soc.	JOURNAL OF THE MICHIGAN STATE MEDICAL SOCIETY (ST. PAUL, MIN.)
J. Obst. Gyn. Brit. Empire	JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY OF THE BRITISH EMPIRE (ALTRINCHAM)
J. Gen. Physiol.	JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY (BALTIMORE)
J. nat. Cancer Inst.	JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE (WASHINGTON)
J. Oral. Surg.	JOURNAL OF ORAL SURGERY (CHICAGO)
J. Urol.	JOURNAL OF UROLOGY (BALTIMORE)
Klin. Mbl. Augenh.	KLINISCHE MONATSBLÄTTER FÜR AUGENHEIL-KUNDE
Klin. oczna	KLINICHESKAIA MEDITSINA (MOSKVA)
Klin. Wschr.	KLINISCHE WOCHENSCHRIFT (BERLIN)
Lancet	LANCET (LONDON)
Magy. nőr. lap.	MAGYR NÖORVOSOK LAPJA (BUDAPEST)
Maroc med.	MAROC MÉDICAL (CASABLANCA)
Med. cir. farm., Rio	MEDICINA, CIRURGIA, FARMACIA (RIO DE JANEIRO)
Med. españ.	MEDICINA ESPAÑOLA (VALENCIA)
Med. klin., Berl.	MEDIZINISCHE KLINIK (BERLIN)
Minerva chir., Tor.	MINERVA CHIRURGICA (TORINO)
Minerva gin., Tor.	MINERVA GINECOLOGICA (TORINO)
Minerva otorinolar.	MINERVA OTORINOLARINGOLOGICA (TORINO)
Minerva pediat., Tor.	MINERVA PEDIATRICA (TORINO)
Nature	NATURE (LONDON)

Nord. med.	NORDISK MEDICIN (STOCKHOLM)
N. York State J. M.	NEW YORK STATE JOURNAL OF MEDICINE (NEW YORK)
Obst. Gyn.	OBSTETRICS AND GYNECOLOGY (NEW YORK)
Obst. gin. lat. amer.	OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA LATINO- AMERICANÁS (BUENOS AIRES)
Odont. rev. Lund	ODONTOLOGISK REVY (LUND)
Oral surg.	ORAL SURGERY, ORAL MEDICINE AND ORAL PATHOLOGY (SAINT LOUIS)
Orv. hetil.	ORVOSI HETILAP. (BUDAPEST)
Ortop. travm. protez., Moskva	ORTOPEDIJA, TRAVMATOLOGIJA I PROTEZIROVANIE (MOSKVA)
Pédiatrie	PÉDIA TRIE (LYON)
Pediat. polska	PEDIATRIA POLSKA (WARSZAWA)
Physiol. Rev. Baltim.	PHYSIOLOGICA REVIEWS (BALTIMORE)
Polski tygod. lek.	POLSKI TYGODNIK LEKARSKI (WARSAWA)
Postgrad. M. J., Lond.	POSTGRADUATE MEDICAL JOURNAL (LONDON)
Practitioner, Lond.	PRACTITIONER (LONDON)
Prensa méd. Argent.	PRENSA MÉDICA ARGENTINA (BUENOS AIRES)
Presse méd.	PRESSE MÉDICALE (PARIS)
Proc. R. Soc. M., Lond.	PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY OF MEDICINE (LONDON)
Przegl. derm., Warsz.	PRZEGLAD DERMATOLOGII I WENEROLOGII (WARSZAWA)
Psychiat. Q.	PSYCHIATRIC QUARTERLY (UTICA)
Radioterapia, Bologna	RADIOTERAPIA, RADIOBIOLOGIA E FISICA MEDICA (BOLOGNA)
Rev. clín. españ.	REVISTA CLÍNICA ESPAÑOLA (MADRID)
Rev. españ. otoneuroft.	REVISTA ESPAÑOLA DE OTO-NEURO- OFTALMOLOGIA Y NEUROCIRURGIA (VALENCIA)

Rev. méd. Moyen Orient.	REVUE MÉDICALE DU MOYEN ORIENT (Beyrouth)
Rev. prat. Par.	REVUE DU PRATICIEN (PARIS)
Rev. st. med., med., int., Bucur.	REVISTA STIINTELOR MEDICALE. MEDICINA INTERNA (BUCURESTI)
Rev. tuberc., Par.	REVUE DE LA TUBERCULOSE (PARIS)
Rhumatologie	RHUMATOLOGIE (AIX LES BAINS)
Riforma med.	RIFORMA MEDICA (NAPOLI)
Riv. crit. clin. med.	RIVISTA CRITICA DI CLINICA MEDICA (FIRENZE)
Riv. ostet., Milano	RIVISTA D'OSTETRICIA E GINECOLOGIA PRATICA (MILANO)
Rozhl chir.	ROZHLEDY V CHIRURGII (PRAHA)
S. Afr. M. J.	SOUTH AFRICAN MEDICAL JOURNAL (CAPE TOWN)
Sem. méd. B. Air.	SEMANA MÉDICA (BUENOS AIRES)
Sicilia san.	SICILIA SANITARIA
Science	SCIENCE (WASHINGTON)
Schweiz. med. Wschr.	SCHWEIZERISCHE MEDIZINISCHE WOCHEN- SCHRIFT (BASEL)
Ugeskr. Laeger	URGESKRIFT FOR LAEGER (KØBENHAVN)
Union méd. Canada	UNION MÉDICAL DU CANADA (MONTREAL)
Urol. polska	UROLOGIA POLSKA (WARSZAWA)
Vest. dermat.	VESTNIK DERMATOLOGII I VENEROLOGII (MOSKVA)
Vest. oft.	VESTNIK OFTALMOLOGII (MOSKVA)
West. J. Surg.	WESTERN JOURNAL OF SURGERY, OBSTETRICS AND GYNECOLOGY (PORTL.)
Zschr. ges. inn. Med.	ZEITSCHRIFT FÜR DIE GES. INN. MED. UND IHRE GRENZGEB. (LEIPZIG)
Zbl. Gyn.	ZENTRALBLATT FÜR GYNÄKOLOGIE (LEIPZIG)

Zschr. Haut u. Geschlkr.	ZEITSCHRIFT FÜR HAUT- UND GESCHLECHTS- KRANKHEITEN (BERLIN)
Zschr. Laryng.	ZEITSCHR. F. LARYNGOLOGIE, RHINOLOGIE, OTOLOGIE U. I. GRENZG. (STGT.)
Z. Rheumaforsch.	ZEITSCHRIFT FÜR RHEUMAFORSCHUNG (DARMSTADT)
Zschr. Urol.	ZEITSCHRIFT FÜR UROLOGIE (LEIPZIG)
S. F.	SILICOSE-FORSCHUNG

I. Fachbücher:

- 1) Gibian, H.
Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen,
Verlag Franz Deuticke, Wien, 1959
- 2) Boenig, H.
Leitfaden der Entwicklungsgeschichte des Menschen,
G. Thieme Verlag, Leipzig 1944, 3. Auflage
- 3) Hauss, W., Losse, H.
Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes,
II. Symposion, G. Thieme-Verlag, Stuttgart 1960
- 4) Leuthardt, F.
Lehrbuch der physiologischen Chemie, Verlag W. d. Gruyter & Co., 1959
- 5) Hoppe-Seyler/Thierfelder
Handbuch der physiologisch und pathologisch chemischen Analyse,
Springer Verlag, 1953, 10. Auflage, Band 5
- 6) Lehnartz, E., Flaschenträger, B.
Physiologische Chemie, Springer Verlag, 1951
- 7) 7. Koll. d. Ges. f. phys. Chemie
Chemie und Stoffwechsel von Binde- und Knochengewebe, 1956
- 8) Ammon, R.
Fermente, Hormone und Vitamine, Band I, Fermente,
G. Thieme V., Stuttgart, 1959
- 13) Bauer, K. Fr.
Ergebnisse der medizinischen Grundlagenforschung Band I,
G. Thieme V., Stuttgart, 1956
- 14) dto.
Band II, G. Thieme V., Stuttgart, 1959
- 15) Ratschow, M.
Angiologie, (Pathologie, Klinik und Therapie der peripheren Durchblutungsstörungen), G. Thieme V., Stuttgart, 1959
- 16) Schwiegk, H.
Künstliche radioaktive Isotope in Physiologie, Diagnostik und Therapie,
Springer V., Bln. 1953

- 17) Vetter, H., Veall, N.
Radioisotopen-Technik in der klinischen Forschung und Diagnostik,
Urb. und Schwarzenberg V., Mü., 1960
- 24) Schwarz, W.
Die Zwischensubstanz des Bindegewebes.
In Kapillaren und Interstitium von Barthelheim und Küchenmeister,
Stuttgart, 1955, S. 29
- 26) Dettmer, N.
Entwicklung und räumliche Anordnung der Interzellulärsubstanz des Bindegewebes und ihre Beziehungen zur Leistung der Bindegewebszellen.
Beitrag zur S. F., Sonderband I, 185 (1955)
- 29) Langenbeck,
Die organischen Katalysatoren, Berlin, 1949

II. Zeitschriften:

- 9) Wallenfels, G.
Angew. Chem. 54, 234 (1941)
- 10) Duran-Reynals, F.,
'Tissue permeability and spreading factors in infection; contribution to host:
parasite problem, Bacteriol. Rev. 6, 197-252 (1942)
- 11) Hahn, L.,
Fermentforsch. 17, 417 (1944)
- 12) Meyer, K.,
Biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase, Physiol. Rev.
27, 335-359 (1947)
- 18) Duran-Reynals, F.,
J. Exper. Med. 50, 327 (1929)
- 19) Chain and Duthie,
Identy of hyaluronidase and spreading factor,
Brit. J. Exper. Path., 21, 324-338 (1940)
- 20) dto.
Mucolytic enzyme in testis extracts, Nature, 144, 977-978 (1939)
- 21) Meyer, K., Palmer, J.W.,
The polysaccaride of the vitreous humor, J. biol. Chem., 107, 629 (1934)
- 22) Schwarz, W.,
Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes, Thieme V., 1960
- 23) Gibian, H.,
Das Hyaluronsäure-Hyaluronidase-System, Erg. Enzymol. 13, 1-84 (1954)
- 25) wie 7), Glynn, L.E., Reading, C.A.,
Interessante Erscheinungen in der Physiologie des Bindegewebes
- 27) Meier, R.,
in 14)
- 28) Helferich, B., Grünler, S. und Gnüchtel, A.,
Über Emulsin; XXX. Die fermentative Spaltung von 6.-Halodydrin-beta-d-
Glucosiden und verwandten Verbindungen, Hoppe-Seyler's Zschr. phys.
Chemie 248, 85 (1937)
- 30) Houck, J.C., Pearce, R.H.,
A new bovine testicular mucopolysaccharase,
J. biol. Chem. Baltim. 226, 267-76 (1957)

- 31) Bailey, J.M., French, D.,
The significance of multiple reactions in enzymepolymer systems,
J. Biol. Chem., Baltim. 226, 1-14 (1957)
- 32) Fishmann, F.,
in Sumner-Myrbäck, Bd. I, S. 769 (1951)
- 33) Linker, Meyer und Hoffmann,
The production of unsaturated uronides by bact. hyaluronidases.
J. Biol. Chem., Balt. 219, 13-25 (1956)
- 34) Payza und Korn,
The degradation of heparin by bacterial enzymes,
J. Biol. Chem. Balt., 223, 853, 859 (1956)
- 35) Korn, E.D.,
The degradation of heparin by bacterial enzymes.
III. A comparison of the degradation of heparin, hyaluronic acid and
chondroitinsulfate, J. Biol. Chem. Balt. 226, 841 (1957)
- 36) Weissmann und Meyer,
The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical
cord, J. Amer. chem. Soc. 76, 1753 (1954)
- 37) Freemann, Anderson, Oberg und Dorfmann,
Preparation of purified hyaluronidase from bovine testis, J. Biol. Chem.
Balt. 180, 655 - 62 (1949)
- 38) Högberg,
Acta chem. Scand. 8, 1098 (1954)
- 39) Rasmussen, P.
Purification of testicular hyaluronidase by chromatography, Biochim.
biophysica acta NY., 14, 567 (1954)
- 40) Meyer, K.,
wie 12)
- 41) Chain, E. and Duthie, A.,
wie 19)
- 42) Meyer, K., Chaffee, E., Hobby, G.L., Dawson, M.H.
Hyaluronidase of bacterial and animal origin,
J. exp. Med. 73, 309-326 (1941)
- 43) Boyland, E., Mc Clean, D.,
Brit. J. exp. Path. 41, 2790 (1931)

- 44) Duran-Reynals, F., Stewart, H.L.,
The action of tumor extracts on the spread of experimental vaccina of the rabbit, Amer. J. Cancer 15, 2790 (1931)
- 45) Simpson, M.E.,
Cancer Res. 7, 11 (1947)
- 46) Kiriluk, L.B., Kremen, J., Glick, D.,
Mucolytic enzyme systems; hyaluronidase in human and animal tumors and further studies on serum hyaluronidase inhibitor in human cancer,
J. nat. Cancer Inst. 10, 993 - 1000 (1950)
- 47) Mc Leane, D. and Hale, C.W.,
Studies on diffusing factors; hyaluronidase activity of testicular extracts, bacterial culture filtrates and other agents that increase tissue permeability,
Biochem. J. London 35, 159-83 (1941)
- 48) Korth und Bock,
Ein Beitrag zur Wirkung von Trypsin auf Hyaluronidase, Arzneimittel-Forschung, Aulendorf 5 (1955)
- 49) Greuer und Hess,
Die Therapie mit proteolytischen Fermenten,
Arzneimittel-Forschung, Aulendorf, 4, (1954)
- 50) wie 13)
- 51) Dirscherl und Krushemper,
Steroidhormone und Hyaluronidase, Bioch. Zschr. 323, 1-13 (1952)
- 52) Skanse und Sundblad, L.,
Studies on hyaluronic acid in synovial fluids, Acta phys. Scand. 6, 37 (1943),
- 53) Werle, E., Turtur and Bauereis, R.,
Nachweis und Kennzeichnung einer Anti-Mucopolysaccharidase,
Bioch. Zschr. 319, 337 (1949)
- 54) Amante, S. e Mancini, M.,
Azione della ialuronidasi sulla riparazione di perdite di sostanza cutanee,
Minerva chir. Tor. 10, 774 (1955)
- 55) Nuzum, J.W.,
Effect of hyaluronidase on experimental exophthalmos, Surgery 33, 550 (1953)
- 56) Villegas, R.,
Efecto de la hialuronidasa sobre la resistencia mecanica de los tejidos,
Acta cient. venezolana, 7, 125 (1956)

- 57) Hartman, F., Ziemss, G.
Die Elastizität der Zwischenwirbelscheiben des Kaninchens und der Nabelschnur des Menschen unter der Einwirkung von Hyaluronidase, Z. Rheumaforsch., 13, 307 (1954)
- 58) Mancini, R.E., de Lustig, E.S.,
Acción de la hialuronidasa sobre los mucopolisacaridos de los fibroblastos "in vitro", Chem. Abstr. 45, 192, 8054 (1951)
- 59) Butt, A.J.,
Role of protective urinary colloids in prevention of renal lithiasis, J. Urol. 67, 450 (1951)
- 60) Gibian, H.
wie 23)
- 61) Matheros, B. and Dorman, A.,
Inhibition of Hyaluronidase, Phys. Ref. Balt. 35, 381-402 (1955)
- 61a) Stettbacher,
Klinische Untersuchung zur Verwendung der Hyaluronidase, Helvet. med. acta, 20, 206-210 (1953)
- 62) O' Brien,
J. Amer. Med. Ass., 160, 712 (1956)
- 63) David, J. et Longueville, R.,
Silicose avancée traitée par aérosols de hyaluronidase, Arch. mal. profes., Par., 15, 302 (1954)
- 64) Raimondo,
Considérations sur le scotome arciforme dans la pathologie du camps visuel, Zbl. ges. Ophth. 66, 281 (1959)
- 65) Carriker, F. R.,
Use of hyaluronidase in ophthalmology, Amer. J. Ophth. 35, 1765-68 (1952)
- 66) Hahn, L., Hevesy, G.,
The turnover rate of nucleic acid, Acta phys. scand., Stockh., 1, 3 (1940)
- 67) Hahn, L., Hevesy, G., Rebbe, C.,
Turnover rate of nucleic acid, Nature (Lond.) 145, 548-50 (1940)

- 68) Hevesy, G., Köster, K.H., Sorensen, G., Warburg, E., Zehran, K.,
Red corpuscle content of circulating blood determined by labelling erythrocytes with radio-phosphorus, *Acta med. scand.*, Stockh., 116, 561-76 (1944)
- 69) Hevesy, G., Zehran, K.,
Potassium interchange in human body, *Acta phys. scand.*, Stockh., 3, 123 (1942)
- 70) Brown, F.A. jr., Hempelmann, L. jr., and Elman, R.,
Determination of blood volume with red blood cells containing radio-active phosphorus P^{32} , *Science (Lancaster, Pa.)* 96, 323-4 (1942)
- 71) Govaerts, J.,
Acta biol. belg., 4, 425 (1942)
- 72) Reeve, E.B. and Veall, N.,
Simplified method for determination of circulating redcell volume with radioactive phosphorus, *J. of Physiol.* 108, 12-23 (1949)
- 73) Bayard, P.,
Bull. Soc. roy. Sci. Liège, 11, 620 (1942)
- 74) Govaerts, J. and Lambrechts, A.,
Acta biol. belg. 2, 425 (1942)
- 75) Schwaiger, M. et Schmeisser, K.,
Zur Methodik der Blutvolumenbestimmung mit Radiophosphor (P^{32}), *Klin. Wschr.* 29, 336-40 (1951)
- 76) Robinson, M. and Hunter, D.,
Improved method for labeling red cells with radioactiv phosphorus, *Lancet*, 1, 766 (1958)
- 77) Sheppard, C.W. and Martin, W.R.
Cation exchange between cells and plasma of mammalia blood; methods and application to potassium exchange in human blood, *J. Gen. Physiol.* 33, 703-22 (1950)
- 78) Raker, J.W., Taylor, J.M., Weller, J.M. and Hastings, A.B.,
Rate of potassium exchange of human erythrocyte, *J. Gen. Physiol.* 33, 691-702 (1950)

- 79) Dean, R.B., Noonan, T.R., Haege, L., and Fenn, W.O.,
Permeability of erythrocytes to radioactive potassium,
J. Gen. Physiol. 24, 353-65 (1941)
- 80) Mullins, L.J., Noonan, T.R. and Haege, L.,
Permeability of erythrocytes to radioactive potassium, Amer. J. Physiol.
135, 93-101 (1941)
- 81) Maizels, M.,
Cation control in human erythrocytes, J. of Physiol. 108, 247-263 (1949)
- 82) Ponder, E.,
K-Na exchange accompanying prolytic loss of K from human red-cells,
J. Sen. Physiol. 30, 379-87 (1947)
- 83) Guilleman, P.,
Les hyaluronidases; leurs applications thérapeutiques actuelles.
Rev. prat., Par., 4, 2945-55 (1954)
- 84) Kermogant, Y.,
Cellulite et hyaluronidase, Concours méd. 80, 1325-26 (1958)
- 85) Meier-Stauffer, G.,
Bericht über die Erfahrung mit der Hyaluronidase,
Wien. Klin. Wschr., 67, 35-37 (1955)
- 86) Scarborough, H.,
Hyaluronidase, Practitioner, Lond. 174, 335-40 (1955)
- 87) Peris Ruiz, L.,
Aplicaciones terapeuticas de la hialuronidasa.
Rev. clin. españ. 56, 343-49 (1955)
- 88) Pedich, W.,
Use of Hyaluronidase in medical Practice, Polski tygod. lek. 10,
845-7, (1955)
- 89) Kühnelt, H.J.,
Der gegenwärtige Stand der Hyaluronidaseforschung und ihre Anwendungsmöglichkeiten in der Praxis,
Zbl. Gyn., 76, 1596-1602 (1954)
- 90) Branchi, P.P., Manora, E.,
La jaluronidasi e le sue applicazioni in O. R. L.,
Minerva otorinolar. 6, 125-8 (1956)

- 91) Rosollek, H.,
Resorptionsbehandlung mit Hyaluronidase, Medizinische 24, 991-3 (1958)
- 92) Oberna, F., Dukay, S.,
Surgical use of Hyaluronidase, Orv. hetil. 97, 859-61 (1956)
- 93) Burkhardt, V.,
Einige Erfahrungen mit der Hyaluronidase in der Chirurgie,
Zbl. Chir., 81, 2037-41 (1956)
- 94) Aderhold, K.,
Die Möglichkeit der Anwendung von Hyalase, einem neuen Hyaluronidase-
präparat in der Chirurgie, Zbl. Chir. 79, 2003-08 (1954)
- 95) Katz, J.,
Hyaluronidase in surgical dissection, S. Afr. M. J. 31, 703, (1957)
- 96) Rössing, P., and Lutterbeck, H.,
Hyaluronidase therapy of inflammatory and degenerative joint diseases,
Rheumatism. Lond., 10, 76-84 (1954)
- 97) Li, C. T.,
Results of use of rhonidase in treatment of scar contractures of the joints after
burns and trauma, Ortop. travm. protez. Moskva, 19, 40-43 (1958)
- 98) Köstler, J.,
Hyaluronidase in der Nachbehandlung operierter Gelenke, Hefte z. Unfallh.
52, 224-25 (1956)
- 99) Gjørup, L.,
Tibial periostosis treated with hyaluronidase, Ugeskr. layer, 10, 40-1, (1957)
- 100) Bodian, H.B.,
Treatment of ankle sprain with hyaluronidase iontophoresis, J. Nat. Ass.
Chiropod, 45, 34 (1955)
- 101) Kendall,
Hyaluronidase in the treatment of acute sprained ankle; a preliminary report.
Ann. Phys. M., Lond. 2, 95-97 (1954)
- 102) Sándor, R., Riesz, E.,
Use of hyaluronidase electrophoresis in the diseases of the locomotive system,
Orv. hetil 97, 19-21 (1956)
- 103) Priorov, N.N.,
Use of hyaluronidase in treating sequels of trauma, Khirurgiia, Moskva,
6, 15-19 (1955)

- 104) Priorov, N.N. et. al.,
Certain aspects of enzymatic therapy of traumatic sequelae, *Khirurgiia*, Moskva, 32, 41-46 (1956)
- 105) Rosenberg, A.B.,
A new method for treating slow-healing wounds, *Postgrad. M.*, 23, 49-52 (1958)
- 106) Kramer, G.,
Zur Behandlung schwerer Weichteilverletzungen mit Varidase, *M Schr. Unfallh.*, 60, 331-34 (1957)
- 107) Bruck, H.,
Zur Verwendung von Hyaluronidase in der Unfallheilkunde, *Wien. Klin. Wschr.*, 66, 827-29, (1954)
- 108) Canónico, A.N.,
Hyaluronidase as an aid in operative dissection of perivisceral adhesions, *Prensa méd. argent.* 43, 880 (1956)
- 109) Weiss, A.G., Hollender, L.,
Indications et contre-indications de l'hypodermoclyse postopératoire avec hyaluronidase en chirurgie digestive, *J. chir. Par.*, 71, 673-86 (1955)
- 110) Myburgh, A.L.,
Causes and treatment of abdominal adhesions, *Arch. chir. neerl.* 6, 112-122 (1954)
- 111) Giglio, A.L.,
La jaluronidasi nella preperitoneali post-operatorie; richerche sperimentali. *Arch. ital. chir.* 78, 89-110 (1954)
- 112) Benchimol, A.S.,
Hialuronidasa y prevención de haematomas post-operatorios, *Prensa mém. argent.*, 43, 489-92 (1956)
- 113) Gathings, J.G.,
The treatment of keloids with a combination of hyaluronidase and kutapresin, *Am. J. Surg.* 88, 429-30 (1954)
- 113a) Belisario, J.C.,
The treatment of keloids, *Acta derm. vener. Stockh.* 37, 165-81 (1957)
- 114) Grenda, J.,
Hyaluronidase therapy of Keloid, *Przegl. derm.*, Warsz. 8, 329-32, (1958)

- 115) Schneider, H.C.,
Further experiences with hyaluronidase in anorectal surgery, J. Internat. Coll. surgeons., 27, 755-60 (1957)
- 116) Otaíza, E. y Muñoz, F.
Uso de la hialuronidasa en hipodermocclisis rapida,
Rev. brasil. cirurg. 29, 501-11 (1955)
- 117) Catchpool, J.F., and Lunn, H.F.
Hyaluronidase and infections of the hand,
Lancet, Lond. 271, 1074-75 (1956)
- 118) Clifton, E.E.,
Healing of infected wounds treated with human plasmin und hyaluronidase,
A. M. A. Arch. Surg., 74, 207-14 (1957)
- 119) Spier, J.R., Rees, T., Clifton, E.E.,
Treatment of infected wounds and chronic sinus tracts with enzymes; plasmin (fibrinolysin) and hyaluronidase and antibiotics, Am. J. Surg. 92, 496-506 (1956)
- 120) Heymann, J.,
Lokalanästhesie mit Hyaluronidasezusatz,
Deutsch. med. Wschr. 79, 1223-24 (1954)
- 121) Wild, H.,
Wesentliche Verbesserung der Lokalanästhesie durch zweistufige Injektion mit Hyaluronidase, Schweiz. med. Wschr. 84, 1067-68 (1954)
- 122) Wild, H.,
Two-step injection with hyaluronidase, an essential improvement of local anaesthesia, Odont. rev. Lund, 5, 262-96 (1954)
- 123) Dánis, A.,
L'hyaluronidase dans l'anesthésie locale et régionale, Acta chir. bel. 57, 353-54 (1958)
- 124) Durrieu, C.A.,
La hialuronidase como coadyuvante de la anestesia local; su aplicación en cirugía oral, Am. paul. med. cir. 68, 407-10 (1954)
- 125) Schneider, H.C.,
Hyaluronidase with local anesthesia in anorectal surgery, 88, 703-36 (1954) in Am. J. Surg.

- 126) Scott, D.B.,
Hyaluronidase in epidural analgesia, Brit. J. Anaesth. 28, 187-93 (1956)
- 127) Silio, G.,
Über die Verwendung von Hyaluronidase bei der parametranen Anaesthesie,
Anaest. Berl. 7, 77 (1958)
- 128) Hudgkins, A.P.,
Local anesthesia for the uterus and cervix, West. J. Surg., 64, 37-8 (1956)
- 129) Gagliardi, F., Franco, G.,
Rilassamento perineale e blocco dei n. pudendi nel parto indolore e con
dietilamino-2-6-dimetil-acet-anilide, jaluronidasi ed adrenalina,
Riv. ostet. Milano, 37, 522-28 (1955)
- 130) Hibbard, B.M., Grassie E.D.,
The use of lignocaine and hyaluronidase for pudendal nerve block,
J. Obst. Gyn. Brit. Empire, 62, 939-42, (1955)
- 131) Massano, A., Monticelli, S.,
Blocco dei nervi pudendi con associazione di novocaina, adrenalina e
jaluronidasi in ostetricia, Minerva gin., Tor, 6, 641-44 (1954)
- 132) Woosley, E.L.,
Pudendal block anesthesia for routine use, Am. J. Obst. 69, 128-34 (1955)
- 133) De Alvarez, R.R., Gray, E.W.,
Influence of hyaluronidase and epinephrine on pudendal block anaesthesia,
Obst. Gyn. 4, 635-41 (1954)
- 134) Valentin, H.,
Über günstige Erfahrungen mit Hyaluronidase in Geburtshilfe und Gynäkolo-
gie, Zbl. Gyn. 76, 1216-20 (54)
- 135) Frenzel, K.H.,
Dammschutz mit Hyaluronidase, Zbl. Gyn. 76, 1602-4 (1954)
- 136) Mink, E.,
Dammschutz mit Hyaluronidase, Zbl. Gyn. 78, 1022-4 (1956)
- 137) Mink, E.,
Erfahrungen mit der erweichenden Wirkung der Hyaluronidase (Kinetin) auf
hohe und rigide Dämme Erstgebärender, Geburtsh. u. Frauenh., 15,
246-48 (1955)

- 138) Rimbach, E., Griefahn, S.,
Kritische Wertung des Dammschutzes mit Hyaluronidase, Zbl. Gyn. 77,
546-48 (1955)
- 139) Bollodi, D. et al.,
Painless labor by perineal infiltrations of a new anesthetic combined with
adrenalin and lyophilized hyaluronidase, Riv. ostet., Milano, 40,
411-22 (1958)
- 140) Vrobel, T.,
Protection of the maternal perineum and the fetal head during labor with
the aid of hyaluronidase, Cesk. Gyn. 21, 299-304 (1956)
- 141) Savi, C.,
Oxytocic therapy with hyaluronidase, Minerva gin. Tor., 7, 622-7 (1955)
- 142) Labrum, A. H.,
Ergometrine with hyaluronidase, Lancet, Lond. 269, 522-23 (1955)
- 143) Dutton, W. A.,
The use of ergometrine with hyaluronidase to prevent post-partum haemorrhage, J. Obst. Gyn. Brit. Empire, 65, 315-20 (1958)
- 144) Cristianini, G.,
Hyaluronidase in the prevention of perineal lacerations, Q. clin. obstet. 11,
673-82 (1956)
- 144a) Savi, C.,
Parto pilotato e provocato con perfusione venosa della miscela ossitocina-
jaluronidasi, Minerva gin., Tor., 8, 343-51 (1956)
- 145) Jonas, E. G.,
The prevention of postpartum haemorrhage; a reappraisal, Postgrad. M. J.,
Lond., 34, 601-4 (1958)
- 146) Louros, N. C., Hatji-Emmanuel, E., Kasavelis, D.,
Maroudis, D., et Gouscos, A.,
L'influence de la novocaïne, du phénergan, du largactil et de l'hyaluronidase sur l'éclampsie et l'éclampsie, Gyn. obst., Par., 54, 209-7 (1955)
- 147) Zaleski, Z.,
Attempted application of hyaluronidase in obstetrics, Polski. tygod. lek.
12, 1196-98 (1957)
- 148) Bayer, R.,
Die Behandlung alter parametraner Infiltrate mit der Permease (Hyaluronidase) Iontophorese. Zbl. Gyn. 77, 1348-52 (1955)

- 149) Reiffenstuhl, G.,
Zur Behandlung chronischer schwerer Parametritiden, Zbl. Gyn. 79,
1257-62 (1957)
- 150) Blaton, A.,
Traitment de certaines formes d'infection génitale de la femme par de
antibiotiques associés à l'hyase. Presse méd. 63, 1651-52 (1955)
- 151) Garnier, G., Serres, J., Vieu, J.,
L'hyaluronidase associée aux antibiotiques locaux dans le traitement des
cervicites, Bull. Soc. fr. derm. syph. 61, 365-67 (1954)
- 152) Kluger, H. A.,
Die Behandlung akuter und subakuter Tubenkatarrhe mit Hydrocortison und
Hyaluronidase pertubar. Zschr. Laryng, 37, 451-54 (1958) (betr. Otologie)
- 153) Kupman, A. A.,
Irrigation with hyaluronidase and antibodies in the treatment of the tubal
factor, Obst. gin. Lat. amer. 15, 84-9 (1957)
- 154) Schmidt-Matthiesen, H.,
Die Verwendung der Hyaluronidase bei der Operation der Aplasia vaginae,
Zbl. Gyn. 78, 416-18 (1956)
- 155) Ramierz, O.,
Tratamiento de la queilitis exfoliativa del labio inferior con la hialuronidasa;
reporte de 4 casos. Arch. col. med. Salvador, 8, 124-30 (1955)
- 156) Du Condray, R.,
Traitment de la stérilité féminine par les injections intra-tubaires d'hyalu-
ronidase associée aux antibiotiques, C. rend. Soc. fr. gyn. 25, 49-57 (1955)
- 157) Mink, E.,
Die intramammäre Injektionsbehandlung der Mastitis puerperalis mit leben-
den Streptokokken und Hyaluronidase, Hippokrates, Stuttg., 25, 639-43
(1954)
- 158) Colacurcia, A.,
Terapia dell'ingorgo mammario con ossitocina e jaluronidasi, Riforma med
71, 1184-88 (1957)
- 159) Cappeti, C. A.,
L'estratto post ipofisario associato a jaluronidasi nella profilassi e terapia
dell'ingorgo mammario, Minerva gin., Tor. 8, 351-57 (1956)

- 160) Montero Rodríguez, A.,
Hyaluronidase in the dehydration of the infant, and older child,
Med. españ. 32, 523-29 (1954)
- 161) Freisleder, W., Schweier, P.,
Über die Behandlung subduraler Ergüsse im Säuglingsalter mit Hyaluronidase,
Münch. med. Wschr. 99, 331-35 (1957)
- 162) Bodenheimer, J. M.
Some specific uses of hyaluronidase, J. Louisiana M. Soc. 110, 227-8 (1958)
- 163) Dorn, W.,
Untersuchung über die lokale Anwendung eines Hydrocortison-Hyaluronidase-
Gemisches. Ther. Gegenwart, 96, 19-21, (1957)
- 164) Stelzer, R.,
Die Wirkungssteigerung örtlich anzuwendender Antibiotica in Kombination
mit Hyaluronidase, Wien. med. Wschr. 105, 46-47 (1955)
- 165) Monnet, P., Gilly, R., Lévy, M.,
Hypodermolyse de sang chez le nourrisson avec facteur de diffusion,
Pédiatrie, 9, 481-84 (1954)
- 166) Picinelli, O.,
Nuove possibilità terapeutiche offerte da alcuni enzimi, Farmaco, ed.
Prat. Pavia, 9, 71-80 (1954)
- 167) De Nunno, R.,
L'azione della ialuronidasi nei fratturati; nota clinica, Riv. crit. clin.
med. 53, 323-32 (1953)
- 168) Peres, E.,
Eine neue Behandlungsmethode des angeborenen Schiefhalses, Kinderärztl.
Prax. 25, 410 (1957)
- 169) Garret, A. A.,
Hyaluronidase injections for lepromatous nerve reaction, Leprosy Rev. Lond.,
27, 61-63 (1956)
- 170) Earp, F. De, S.,
Hemiplegia secundária a hemorragia cerebro-meningéa tratada por
hialuronidase, cum recuperação total.
Arg. brasil. med. 44, 217-20 (1954)

- 171) Pezzini, G.C.,
Su qualche probabile effetto terapeutico ottenuto con il trattamento di neoplasie maligne con l' associazione lecitinasi A, globulina gamma e ialuronidasi, Gazz. med. ital. 114, 105-10 (1955)
- 172) Bergonzini, R., Canossi, G.C.,
Trattamento dei cheloidi con infiltrazioni locali di ialuronidasi associate a roentgenterapia, Radioterapia, Bologna, 12, 389-411 (1957)
- 172a) Vilanova, X., Cardenal, C.,
Oleomas; ensayo de tratamiento con hialuronidasa y radioterapia, Actas derm. sif., Madr. 46, 57-9 (1954)
- 173) Lemke, G.,
Zur Differential-Diagnose und Therapie der Ganglien,
Zschr. Haut und Geschlkr., 24, 161-64 (1958)
- 174) Finochietto, R.,
Gangliones de la muficca, Rev. brasil. chirg. 34, 101 (1957)
- 175) Anderson, J.B., Bollinger, J.A.,
Hyaluronidase installation in treatment of ganglia; a preliminary report, U.S. Armed Forces M.J., 6, 69-73 (1955)
- 176) Cortinovis, R., Bono, F., Campani, M.,
Nuovo metodo di terapia incrueta del ganglio tenogeno; ricerche istochimiche sulla parete del ganglio e viscosimetriche del liquido contenutovi, Minerva chir. Tor. 12, 1366-68 (1957)
- 177) Degen, C.E.,
Injektionsbehandlung von Ganglien mit Hyaluronidase und Glucosteroiden, Med. Klin. Berl. 52, 2124-5, (1957)
- 178) Mushine, W.W.,
Intramuskular gallamine with hyaluronidase, Anaesthesia, Lond., 11, 135-8 (1956)
- 179) Zeligman, J.,
Hyaluronidase - therapy of synovial cysts.
A. M. A. Arch. Derm. 76, 111-12 (1957)
- 180) Garbiński, T., Nowalany, J.
Hyaluronidase in vollaps therapy in pulmonary tuberculosis, Polski tygod. lek. 9, 530-31, 1954

- 181) Dumon, G., Toranger, I., Chanas, P.,
Emploi des aérosols sub-continus d'isoniazide et hyaluronidase dans les
tuberculoses pulmonaires gravissimes; un an et demi d'expérience, *Rev.
tuberc. Par.*, 18, 935-42 (1954)
- 182) Bischoff, H. W.,
Acute upper respiratory infection in Western Texas: a five year clinical
study including local treatment with a new preparation, *Antibiotic M.* 1,
285-95 (1955)
- 183) Barbeito, A. M.,
Aerosol de isoniácida e hialuronidasa en las formas bronquiales de la
tuberculosis, *Sem. méd. B. Air.* 111, 1210-3, (1957)
- 184) Abello, J.,
Die Hyaluronidase in der Aerosoltherapie der Lungentuberkulose, *Zschr. f.
Aerosol. Forsch.* 3, 233-61 (58)
- 185) Batycki, W.,
Results of conservative treatment with hyaluronidase of tuberculose empyema,
Gruźlica, 24, 99-106 (1956)
- 186) Garbiński, T. et al.
Use of hyaluronidase to enhance effectiveness of isonicotinic acid hydrazide
after intrabronchial installation, *Gruźlica*, 26, 205-9 (1958)
- 187) Morawsky, Z.,
Hyaluronidase therapie of pleural emphyema with open spontaneous
pneumothorax, *Pediat. polska* 30 (1955) 833-5
- 188) Bross, W., Garbinski, T.,
Biochemische Decortication mittels Hyaluronidase als neues Heilverfahren
beim chronischen Pleuraempyem, *Schweiz. med. Wschr.* 85, 774-7 (1955)
- 189) wie 188) in *Gruźlica* 22, 635-41 (1954)
- 190) David, J., Longueville, R.,
Silicose avancée traitée par aérosols de hyaluronidase,
Arch. mal. profes. Par., 15, 302-3 (1954)
- 191) Rombola, G., Politi, E. et al.,
Treatment of silicosis with hyaluronidase; first clinico-radiological results,
Fol. med., Nap. 38, 734-40, 1955
- 192) Hajos, K. et al.
Therapy of bronchal asthma by mucus drainage and hyaluronidase-
hydrocortisone-prednisone aerosol. *Orv. hetil.* 99, 166-67 (1958)

- 193) Hajos, K., Hajos, M.,
Erfolge mit Schleimabsaugen und Hyaluronidase-Hydrocortison-Aerosolbe-
handlung bei Bronchialasthma, *Acta allerg. Kbh.*, 12, 350-5 (1958)
- 194) Friedrich, L.,
Behandlung der subchronischen Pneumonie mit Hyaluronidase-aerosol;
vorläufg. Mitteilung. *Schweiz. Med. Wschr.*, 84, 1178-79 (1954)
- 195) Gençer, F.,
A new method in acute pulmonary haemodynamics in mitral stenosis,
Cardiologia, Basel, 31, 469-74 (1957)
- 196) Bloxson, A.,
Resuscitation of the newborn infant; a preliminary clinical report on the use
of a detergent and a spreading factor as aids in pulmonary expansion,
Anesthesiology, 16, 41-7 (1955)
- 197) Cartagenova, C., Caiati, M.,
Sulla possibile antiedemic action of hyaluronidasi, *Minerva pediat. Tor.*,
6, 959-62 (1954)
- 198) Fry, W. et al.,
Action of hyaluronidase in reabsorption of localized edema. *Rev. paul.
med.*, 47, 119-30 (1955)
- 199) Schwartz, M.S.,
Use of hyaluronidase by iontophoresis in treatment of lymphedema.
A. M. A. Arch. Int. M., 95, 662-68 (1955)
- 200) Lohmeyer, Kl., Schilling, H.,
Über die Behandlung alter Ödeme. *Münch. Med. Wschr.* 100, 938-9 (1958)
- 201) Mc Daniel, L.W., Hohf, I.C.,
Use of hyaluronidase to reduce edema in severe compound fracture of an
extremity; clinical report, *J. Am. M. Ass.*, 163, 1358 (1957)
- 202) Mufson, J., Goldman, L. et al.,
Treatment of edema caused by chronic phlebo thrombosis and other
peripheral vascular diseases with hyaluronidase, *N. York State J.M.*, 56,
2093-97 (1956)
- 203) Bellis, E., Campilongo, M.,
Clinical Studies in the use of hyaluronidase in the treatment of edemas and
serious effusions, *Riforma med.* 70, 907-10 (1956)

- 204) Johanny, R.,
Streptococcal elephantiasis of the lips treated with hyaluronidase, Rev. méd.
Moyen orient. 14, 61-3 (57)
- 206) Jost, F.,
Zur Insulinempfindlichkeit der Schizophrenen;
Insulineinsparung durch Hyaluronidase, Wien. Klin. Wschr. 70, 657-61 (1958)
- 207) Keup, W.,
Amorphes Insulin und Hyaluronidase in der Insulinbehandlung der Psychosen.
Schweiz. med. Wschr. 87, 1128-31 (1957)
- 208) Schmidt, K.E., Tong, J.,
Measurements of effects of hyaluronidase in insulin coma treatment,
J. Ment. sc. Lond. 104, 1136-48 (58)
- 209) Voyer, V., Racine, R., Waterkeyn, M.,
Insulinothérapie avec alidase en plusieurs injections. méthode Sacerdoti-
Yagdjoglou, Union med. Canada 86, 861-65 (1957)
- 210) Holden, J.C., Mc Guinness, O.L.,
Use of hyaluronidase in insulin coma therapy, Brit. M. J., 5036 (1957) 85-6
- 211) Pargiter, R.A.,
Use of hyaluronidase in insulin coma. Dis. Nerv. Syst. 18, 194-5 (1957)
- 212) Tyndel, M.,
Hyaluronidase as an adjuvant in insulin shock therapy, J. Am. M. Ass.,
162, 32-4 (1956)
- 213) Alexander, S.P. et al.,
The use of hyaluronidase with insulin in insulin coma therapy,
Psychiat. Q. 30, 89-95 (1956)
- 214) Brauner, R., Sotu, E., Vainer, H.,
Testicular hyaluronidase in therapy of rheumatism. Rev. st. med., med.
int., Bucur. 6, 53-58 (1954)
- 215) Deslous-Paoli, P.,
Quelques essais de l'hyaluronidase en rhumatologie.
Rhumatologie, 4, 209-12 (1954)
- 216) Tachowská, M., Warausová, V.,
Experiences with hyasa in poliomyelitis. Čas. lék. čes. 93, 868-70 (1954)

- 217) Taylor, J.R., Alcock, A.J., Hildes, J.
Hyaluronidase and renal calculi in polyomyelitis,
Am. J. M. Sc. 230, 536-40 (1955)
- 220) Nowacki, F.,
Value of hyaluronidase in local treatment of nephrolithiasis, Urol. polska.,
8, 50-54 (1955)
- 221) Butt, A.J.,
Clinical management of renal lithiasis with hyaluronidase, J. Urol.,
Balt., 72, 337-41 (1954)
- 222) Dingley, A.G., Badenoch, A.W.,
The influence of hyaluronidase in renal lithiasis, Proc. R. Soc. M.,
Lond. 47, 809-11 (1954)
- 218) Buliński, W.,
Application of hyaluronidase in urology; review.
Urol. polska, 8, 183-89 (1955)
- 223) Smiddy, F.G.,
Hyaluronidase and urinary stone, Proc. R. Soc. M., Lond., 47, 808-9
(1954)
- 224) Genot, R.,
Place des thérapeutiques récentes dans le traitement de la lithiase urinaire
phosphocalcique. Presse méd. 63, 932-34 (1955)
- 225) Kočvara, S.,
Eine neue Methode der lokalen Anwendung von Antibiotika in der Therapie
der unspezifischen Urethritiden. Zschr. Urol., 50, 662-71 (1957)
- 226) wie 225) in Rhozh. chir. 36, 343-51 (1957)
- 227) Bodner, H., Howard, A.H., Kaplan, J.,
Peyronie's disease: cortison-hyaluronidase-hydrocortisone therapy,
J. Urol. Balt. 72, 400-403 (1954)
- 228) Laurence, K.M., Eadie, J.W.,
Extravasation of urine after irrigation of the bladder with hyaluronidase,
Lancet, Lond. 267, 736-7, (1954)
- 229) Seliger, H.,
Experimentelle u. klinische Untersuchungen über die Wirkung von Hyaluronidase bei Gallensteinen. Zschr. ges. inn. Med., 11, 1050-51 (1956)

- 230) Rodriguez Moreno, T.,
Hialuronidasa en dermatología, *Actas dermat. sif. Madr.*, 47, 385-88 (1956)
- 231) Braun-Falco, O.,
Über die Bedeutung der Hyaluronidase für das Ekzem.
Derm. Wschr., 130, 1079-87 (1954)
- 232) Johanasson, S., Möller, F.,
Hyaluronidas vid scleroderma, *Nord. med.* 58, 1089 (1957)
- 233) Khmel'nitskii, R. Kh.,
Result of treatment of scleroderma with lidase,
Vest. dermat., 32, 66-8 (1958)
- 234) Wendlberger, J., Kubin, J.,
Hyaluronidase-Iontophorese bei Scleroderma circumscripta, *Wien med. Wschr.* 104, 903-4 (1954)
- 235) Scuteri, E.,
Due casi di sclerodermia in immaturi quarti mediante infiltrazioni sottocutanei ialuronidasi, *Gazz. med. ital.* 113, 321-22 (1954)
- 236) Neumann, E.,
Behandlung von Onychomykosen durch Nagelablation unter Anwendung von Hyaluronidase, *Derm. Wschr.* 136, 746-48 (1957)
- 237) Goldberg, H. C., Hanfling, S. L.,
Alopecia areata and other common scalp problems.
J. M. Soc. N. Jersey, 55, 197-98 (1958)
- 238) Bauer, K. M.,
Zum derzeitigen Stand der Behandlung der Harnröhrenstriktur, *Medizinische* 51, 1821-22 (1956)
- 239) Aderhold, K.,
Zur fermentativen Behandlung von Harnröhrenstrikturen,
Zschr. Urol. 48, 177-82 (1955)
- 240) Firstrater, M.,
Hyaluronidase in the treatment of penoscrotal hematoma.
Rev. argent. urol., 24, 756-60 (1955)
- 241) Axler, G.,
Hyaluronidase treatment of scrotal haematoma,
J. Urol., Balt. 72, 889-91 (1954)

- 242) Pérez Coutiño, A.,
Hidrocele; tratamiento con hialuronidasa,
Arch. españ. urol. 12, 60-66 (1956)
- 243) Bacher, K.R.,
Hyaluronidase zur Behandlung der Paraphimose,
Zbl. Chir. 81, 23-24 (1956)
- 244) Doyle, J.O.,
Hyaluronidase in treatment of sequela of paraphimosis.
Brit. M. J., 4901, 1401 (1954)
- 245) Bavastrelli, A.,
Nuovo trattamento della parafimosi con iniezioni sotto-cutanee locali
di jaluronidasi, Sicilia san. 8, 99, (1955)
- 246) Krivec, O.,
Priapism, trial therapy with liquemin and hyaluronidase, Acta chir.
iugosl. 2, 86-92 (1955)
- 247) Fantoni, S.,
Sopra un caso di priapismo di origine traumatica.
Riforma med. 69, 769-72 (1955)
- 248) Di Giovan Battista, N.,
Hyaluronidasa; su aplicación tópica bajo la forma de polvo liofilizado
en heridas recientes. Día méd., B. Air. 27, 231-32 (1955)
- 249) Raimondo, N.,
Clinical uses of hyaluronidase in ophthalmology,
Boll. ocul. 34, 433-42 (1955)
- 250) Rouher, F.,
Accidents dus à l'utilisation de l^o hyaluronidase en ophtalmologie.
Bull. soc. opht. France, 1-2, 85-92 (1955)
- 251) Goncalves, P.,
Another indication for hyaluronidase in ophthalmology; preliminary note.
Med. cir. farm., Rio. 226/27, 103-07 (1955)
- 252) Selfa, E.,
Empleo de hialuronidasa en oftalmologia.
Rev. españ. otoneuroft. 13, 301-06 (1954)
- 253) Hartmann, E., Topalis, C., Lombard, G.,
Les indications de l^o hyaluronidase en ophtalmologie,
Bull. Soc. fr. opht. 66, 374-78 (1953)

- 254) Nuzzone, A., Ponte, F.,
Treatment of subconjunctival hemorrhage; clinical and experimental trials
with fibrinolytic enzymes and hyaluronidase, *Rass. clin. ter.* 55, 89-98
(1956)
- 255) Julesz, M., et al.,
Decreasing effect of hyaluronidase on exophthalmos; preliminary publicatio.
Orv. hetil. 97, 43-44 (1956)
- 256) Laurent, L.P., Scopes, J.W.,
Hyaluronidase in the treatment of exophthalmic ophthalmoplegia.
Lancet, Lond., 269, 537-38 (1955)
- 257) Marinchev, V.N.,
Hyaluronidase and intraocular pressure. *Vest. oft.* 70, 23-28 (1957)
- 258) Dybicka, A., Kozakiewicz, A.,
Therapeutic value of hyaluronidase in diseases of the cornea.
Klin. Oczna, 27, 607-15 (1957)
- 259) Payrau, P., Perdriel, G., Delbosc, G.,
Hematoma of the vitreous body and the adminstration of streptokinase and
hyaluronidase eyewashes. *Bull. Soc. méd. mil. fr.*, 50, 100-3 (1956)
- 260) Dindina, Z.T.,
New methods of treating trachoma with etazol and rhonidase. *Vest. oft.*
70, 32-36 (1957)
- 261) Papst, W.,
Succinyl-bis-Cholinester als Muskelrelaxans und Hyaluronidase bei der
Staroperation. *Klin. Mbl. Augenh.* 124, 336-45 (1954)
- 262) Franc, Vertrut,
Réflexion au sujet de l'injection rétro-bulbaire de hyaluronidase pour
l'opération de cataracte. *Maroc méd.*, 33, 491-2 (1954)
- 263) Agarwall, L.R.,
Hyaluronidase therapy in pterygium, *Ophthalmol.*, Basel, 132, 382-6 (1956)
- 264) Zaoli, G.,
L'associazione jaluronidasi-antibiotici nella cura dell'otite media acuta
del lattante e del bambino, *Minerva otorinolar.*, Tor., 8, 354-58 (1958)
- 265) Checa Sagra, M.,
Perfusión ático-transtimpánica, *Acta otorinolar. iber. amer.* 9, 43-49 (1958)

- 266) Tarlé, Y.
Several remarks on the technic used in the combined therapy with hyaluronidase and antibiotics in otology. *Ann. otolar.*, Par. 75, 967-69 (1958)
- 267) Henkel, G.H.,
The role and applicability of hyaluronidase in clinical dentistry, *Oral Surg.* 9, 463-92 (1956)
- 268) Antalovská, Z.
Tooth decay prevention value of hyaluronidase *Česk stomat.* 2, 43-48 (1955)
- 269) Hoffmann-Axthelm, W.,
Erfahrungen mit dem Ferment Hyaluronidase in der Behandlung chronischer Arthropathien des Kiefergelenkes. *Deut. stomat.* 4, 3-5 (1954)
- 270) Kochan, E.J.,
Treatment of temporo-mandibular joint disturbances with hyaluronidase, *Oral. Surg.* 9, 513-5 (1956)
- 271) Fleuchthaus, P.T.,
Effect of hyaluronidase on swelling and trismus after removal of impacted mandibular third molar teeth, *Oral Surg.* 9, 493-500 (1956)
- 272) Káčlová, J.,
Hyaluronidase in extraction of impacted lower third molars. *Česk. stomat.* 6, 261-64 (1954)
- 272a) Young, H.E., Kingsbury, B.C. jr.
Hyaluronidase for prevention of edema after removal of impacted mandibular third molars. *J. Am. Dent. Ass.* 50, 418-21 (1955)
- 273) Carothers, F.C.,
Use of hyaluronidase for extractions in patients requiring immediate dentures. *J. Oral. Surg.* 14, 1228 (1956)
- 274) Minarelli, A.,
Hyaluronidase and probenecid combination in the treatment of gout. *Minerva med.*, Tor. 47, 346-8 (1956)
- 275) --
Handbuch der Inneren Medizin, Bd. 6, 1. Teil, S. 706, 707 (1954)
- 276) Dorfman, A., Elster, S.K., Freeman, M.E.
Die Auswirkung der Hyaluronidase, *Am. Journal of Psychology*, 156, 249 (1949)

- 277) Elster, S.K., Freeman, M.E. und Anderson, P.R.,
J. Lab. clin. Med., 34, 834 (1949)
- 278) Matthies, H.,
Über den Mechanismus hyaluronidasehemmender Wirkung der Glucocortoide,
Zschr. f.d. ges. exp. Med. 131, 118-130 (1959)
- 279) Fawcett, W.,
Observations on the submicroscopic structure of small arteries, arterioles
and capillaries, Am. Ass. Anat. 69 (1956)
- 280) Whites, J.F.,
Studies on the growth of blood vessels in vitro,
Am. J. Anat. 94, 127-169 (1954)
- 281) Lindner, J.,
Untersuchungen am Bindegewebe, Habil.-Schrift, Med. Fak. Hamburg
(1957)
- 282) Asboe-Hansen,
The mast cell, Internat. Rev. Cytol. 3, 399-435 (1954)
- 283) Schallock, G., Schmidt-Matthiesen,
Experimentelle Untersuchungen über die Viskositätsänderungen der Grund-
substanz. Verh. Dtsch. Ges. Path. 39, 168-174 (1956)
- 284) Schallock, G.,
Neuere Untersuchungen zur path. Anatomie der Gefäßwand, Nauheimer
Fortbildungslehrgänge, Bd. 23, (1958)
- 285) Sturm, H.,
Die Permeabilität der Gefäße, II. Mitteilung,
Die Resorption, Pflügers Archiv 249, 430-493 (1947)
- 286) Moore, D.H. and Rusha, H.,
The fine structure of capillaries and small arteries,
J. Biophys. and Biochem. Cytol. 3, 457-462 (1957)
- 287) Chambers, R. and Zweifach, B.W.,
Intercellular cement and capillary permeability,
Physiol. Rev. 27, 436/463 (1947)
- 288) Zweifach, B.W.,
Structure of capillary wall, Ann. New York, Acad. Sci. 61, 670-677 (1955)

- 289) Zweifach, B.W.,
The exchange of materials between blood vessels and lymph, in *Connective tissues*. Transactions of the fifth conf. Josiah Macy jr. found. New York (1954)
- 290) Kisch, B.,
Der ultramikroskopische Bau von Herz und Kapillaren, Steinkopf Darmstadt (1957)
- 291) Gersh, P. and Catchpole, H.R.,
The organization of ground substance and basement membran and its significance in tissue injury, disease and growth., *Amer. J. Anat.* 85, 457-522 (1949)
- 292) Clara, M.
Morphol. Probleme der Capillarwand, *Bull. de la Faculté de Med. Istanbul*, 117-133 (1955)
- 293) Hort, W. und Hort, H.,
Beiträge zur Histochemie der Blutgefäßendothelien und der Kapillargrundhäutchen. *Virchows Arch. path. Anat.* 331, 591 (1958)
- 294) Bargmann, W. und Kopp, A.,
Über die Struktur der Blutkapillaren, *Dtsch. med. Wschr.* 83, 1704 (1958)
- 295) Szabo, G. und Magyar, S.,
Die Wirkung der Hyaluronidase auf die Capillarpermeabilität und Lymphbildung. *Zschr. f.d. ges. exp. Med.*, 130, 129-141 (1958)
- 296) Domenjoz, R.,
Untersuchungen über Diffusionsgeschwindigkeiten, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 225, 14 (1955)
- 219) Diese Literaturangabe erübrigte sich nach nochmaliger Überarbeitung.

ANMERKUNG ZUM LITERATURVERZEICHNIS:

In den Jahren 1954 - 1959 erschienen weitere ca. 700 Arbeiten, die in der Monographie über Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen von GIBIAN (1) nicht erfasst sind. Verfasser, Titel und Quellen wurden eruiert, für die vorliegende Arbeit jedoch nicht herangezogen, da sie den Rahmen einer Dissertation mit spezieller Fragestellung gesprengt hätten.

Die Thematik dieser Arbeiten erfasst:

		<u>Arbeiten</u>
Hyaluronsäure betreffend:	Allgemeines	32
	Bestimmung	12
	Wirkung	38
	Metabolismus	62
Hyaluronidase betreffend:	Allgemein	98
	Antagonismus	82
	Wirkung	215
	Bestimmung	36
	Physiologie	14
	Metabolismus	71
	Herstellung	3
	Unverträglichk.	2

L E B E N S L A U F

Am 15.4.1922 wurde ich als zweites Kind des Maschinen-Ingenieurs Kurt Klemm in Gornsdorf/Krs. Chemnitz geboren. Nach dem Besuch von vier Klassen Volksschule, 1928 - 1932, absolvierte ich anschliessend acht Jahre die Oberrealschule für Jungen (Realgymnasium) in Chemnitz. 1940, nach bestandenem Abitur, wurde ich zum Arbeitsdienst eingezogen. 1941 bis 1945 war ich Angehöriger der ehemaligen deutschen Wehrmacht. Ein halbes Jahr wurde ich auf dem Kriegsschauplatz des Balkans, drei Jahre an der Ostfront und ein halbes Jahr im westlichen Kampfgebiet eingesetzt.

1946 - 1948 studierte ich an den Universitäten Leipzig und Heidelberg Humanmedizin. 1948 - 1951 war mein Studium zwangsweise unterbrochen. Nach meiner Flucht aus der sowjetisch besetzten Zone setzte ich 1952 - 1955 mein Studium an der Freien Universität Berlin und der Universität München fort, das ich mit dem Staatsexamen abschloss. Nach vorübergehender berufsfremder Tätigkeit in der Wirtschaft bin ich seit 1958 am Institut und Poliklinik für Physikalische Therapie und Röntgenologie der Universität als Arzt tätig und befinde mich zur Zeit in meiner Röntgen-Facharztausbildung.

Seit 1948 bin ich mit Rosemarie Klemm geb. Lucke verheiratet. Die während der Ehe 1949 und 1950 geborenen Kinder sind verstorben.

München, den 10.1.1961

